

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE EQUINOS:
ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO.

Gesiane Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Novembro - 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GESIANE RIBEIRO – nasceu na cidade de Sertãozinho/SP em 08 de abril de 1978. Coursou o ensino básico na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Grau “Dr. Antônio Furlan Júnior”. Em dezembro de 2001, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal/SP. Em fevereiro de 2002, foi selecionada para o Programa de Aprimoramento Profissional do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP – Jaboticabal/SP, na área de Cirurgia e Anestesiologia de Grandes Animais, concluindo em fevereiro de 2004. Em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, obtendo o título de Mestre em dezembro de 2005. Em março de 2006, iniciou o curso de Doutorado pelo mesmo programa. Em agosto do mesmo ano, deu início a carreira profissional na condição de docente do curso de medicina veterinária da Universidade de Uberaba/MG, ministrando as disciplinas de Patologia Cirúrgica Geral e Clínica Cirúrgica de Grandes Animais, até agosto de 2008, quando se integrou ao corpo docente do Centro Universitário Monte Serrat – UNIMONTE, em Santos/SP, onde é responsável pelas disciplinas de Semiologia, Técnicas Anestésicas e Cirúrgicas e Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais.

DEDICO...

*“Mestre é aquele que inicia o diálogo,
estende a mão e encaminha para a
aventura da vida.*

*Não é o que ensina fórmulas e regras,
mas o que questiona e desperta para a
realidade.*

*Não é aquele que dá de seu saber, mas
aquele que faz germinar o saber do
discípulo.”*

*Ao meu mestre, Professor “Juca”, por ter sido o grande
guia nesta longa caminhada.*

*À querida Cristina Massoco, pela imensa boa vontade e
por tanto conhecimento compartilhado.*

*“Amigos que chegam e ficam,
amigos que passam,
amigos que vão e que retornam.
Amigos novos e velhos, amigos eternos.
Para estes não existem barreiras, distância e tempo”.*

*A todos os meus amigos de Jaboticabal, Uberaba, São Paulo
e Santos, pela alegria do convívio durante esta etapa.*

*“Que a família comece e termine sabendo aonde vai,
e que o homem carregue nos ombros a graça de um
pai.*

*Que a mulher seja um céu de ternura, aconchego e
calor, e que os filhos conheçam a força que brota do
amor.*

Abençoa, Senhor, as famílias. Amém.

Abençoa, Senhor, a minha também.”

*Aos meus pais,
Orlando e Neusa.*

*Aos meus irmãos,
Gislaine e Ricardo.*

Ao meu amor, Cyro.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal/SP, e ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, pela responsabilidade e qualidade da minha formação.

Ao Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, meu orientador desde a iniciação científica, pela confiança que depositou em mim durante esses anos todos, por ter permitido que eu seguisse meu caminho, nunca me afastou dos meus sonhos, eu reconheço e agradeço.

À Prof^a. Dr^a. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, por ter incentivado e possibilitado minhas idéias, disponibilizando seus conhecimentos e todos os recursos necessários para a realização deste projeto.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, Prof. Dr. José Wanderley Cattelan, Prof^a. Dr^a. Márcia Rita Fernandes Machado, Prof^a. Dr^a. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, pela disponibilidade e pela contribuição oferecida ao nosso trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Prof^a. Dr^a. Ana Liz Garcia Alves, Prof^a. Dr^a. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, Prof^a. Dr^a. Silvana Martinez Baraldi Artoni, Prof^a. Dr^a. Márcia Rita Fernandes Machado, pela disponibilidade e pela contribuição oferecida ao nosso trabalho.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
 CAPÍTULO 2 - Análise comparativa da obtenção de células-tronco mesenquimais em equinos a partir da medula óssea e tecido adiposo e viabilidade celular antes e após o congelamento.....	9
1. Introdução.....	10
2. Material e métodos.....	11
3. Resultados e Discussão.....	16
4. Conclusões.....	22
5. Referências.....	22
 CAPÍTULO 3 - Caracterização morfológica e imunofenotípica de células-tronco mesenquimais de equinos obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo em diferentes meios de cultivo celular.....	26
1. Introdução.....	27
2. Material e métodos.....	30
3. Resultados e Discussão.....	33
4. Conclusões.....	50
5. Referências.....	51
 CAPÍTULO 4 – Efeitos do TGF- β 1 na cultura de células-tronco mesenquimais de equinos obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo	56
1. Introdução.....	57
2. Material e métodos.....	59
3. Resultados e Discussão.....	63
4. Conclusões.....	72
5. Referências.....	72

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE EQUINOS: ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO.

RESUMO - As células-tronco da linhagem mesenquimal representam uma fonte promissora para o tratamento de injúrias do sistema músculo-esquelético de equinos atletas. Objetivou-se com este trabalho avaliar técnicas de coleta e isolamento de células-tronco mesenquimais em equinos, determinar a caracterização morfológica e fenotípica e avaliar o comportamento celular sob diferentes condições de cultivo. Cinco cavalos foram submetidos à coleta de medula óssea do esterno e de tecido adiposo da região glútea. As amostras foram processadas para o isolamento de células mononucleares e cultivadas em dois tipos de meios de cultivo. No vigésimo quinto dia, foi adicionado TGF- β 1, mantendo um grupo controle para cada meio. As técnicas de coleta e processamento foram avaliadas por meio de fatores como facilidade de obtenção, viabilidade celular e número de células obtidas. Características morfológicas qualitativas foram avaliadas semanalmente mediante observação das colônias por microscopia óptica de luz invertida. Características fenotípicas foram avaliadas testando-se marcadores de superfície. Os efeitos do TGF- β 1 sobre as culturas de células foram determinados por meio de avaliação citoquímica, número de unidades formadoras de colônia e porcentagens de apoptose e necrose. Foram observadas diferenças entre as amostras em fatores como a viabilidade celular após descongelamento, formação de colônias e relação entre necrose e apoptose em meios de cultivo diferentes. O TGF- β 1 apresentou um efeito indutor de apoptose e estimulou a formação de colônias e a produção de proteoglicanas sulfatadas confirmando o efeito condrogênico.

Palavras-Chave: células-tronco, equinos, medula óssea, tecido adiposo

EQUINE MESENCHYMAL STEM CELLS: ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION.

SUMMARY – Mesenchymal stem cells could be a new treatment for healing musculo-skeletal injuries of equine athlete. The objectives of this study were: to analyze the harvest and isolation techniques of equine mesenchymal stem cells, to determine morphological and phenotypical characterization and to evaluate cellular behavior in different culture conditions. Five horses had sternal aspirates bone marrow and croup fat tissue harvest. Both of them harvested materials was processed for mononuclear cells isolation and cultivate in two different kinds of culture medium. Twenty-five days later TGF- β 1 was add in both culture mediums, remains a control group for each one. The harvest and process techniques were evaluated through some factors like: easily of harvest, cellular viability and cellular number. Morphological qualitative characteristics were described weekly by culture microscopy observation. Phenotypical characteristics were evaluated testing cluster markers. The effects of TGF- β 1 on the cells cultures were determined by histological evaluation, number of unit forming colony and relation between necrosis and apoptosis. Differences between bone marrow and fat tissue cells were observed in some factors like: cellular viability after freezing, unity colony forming and relation between necrosis and apoptosis in different mediums culture. TGF- β 1 showed apoptosis inductor effect and stimulated the unit forming colony and sulfated proteoglicans production confirming the chondrogenic effect.

Keywords: stem cells, horses, bone marrow, fat tissue

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em 1999, as células-tronco foram consideradas a inovação científica do ano pela revista *Science*. Naquele ano, foi demonstrado que células-tronco de tecidos adultos mantinham a capacidade de se diferenciar em outros tipos de tecidos. Desde então, o interesse pelo estudo destas células vem crescendo continuamente entre a comunidade científica, pois o potencial terapêutico das células-tronco para aplicações na engenharia de tecidos e terapia gênica é enorme (PEREIRA, 2008).

Conceitualmente, existem dois tipos gerais de células-tronco potencialmente úteis para essas aplicações: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas. Enquanto o potencial de diferenciação das primeiras está bem caracterizado em camundongos e em humanos, seu uso em terapia celular e em pesquisa tem sido dificultado por questões de histocompatibilidade, segurança e ética. Em contraste, as células-tronco adultas não apresentam estes empecilhos, apesar da extensão de sua plasticidade ainda estar sob investigação (PEREIRA, 2008).

As células-tronco adultas mais conhecidas são aquelas presentes na medula óssea e que, desde a década de 1950, são utilizadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético (PEREIRA, 2008).

A medula óssea é derivada do mesoderma embrionário e é formada por uma população de células-tronco hematopoiéticas (CTHs), suportadas por um estroma mesenquimal (ZUK et al., 2001). As CTHs são as únicas células do sistema hematopoiético que exibem extenso potencial proliferativo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema linfo-hematopoiético. Esta característica se mantém continuamente, até a morte (GASPER, 2000; HERZOG et al., 2003).

Nos últimos anos, uma série de trabalhos vem questionando a visão tradicional sobre as células-tronco adultas, pois tem se verificado indicações de um potencial muito mais amplo de diferenciação, observando-se que estas células são capazes de originar tecidos diferentes daqueles onde estão presentes. Em 2001, KRAUSE et al, conseguiram identificar na medula óssea de camundongo a existência de células-tronco

mesenquimais com enorme capacidade de diferenciação *in vivo*. Estas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, quando injetadas em camundongos receptores, se diferenciaram em células epiteliais do fígado, pulmão, trato gastrointestinal e pele.

LUYTEN (2004) relatou que a população de células-tronco possui papel crítico na manutenção da homeostase e no reparo de tecidos lesados, e que compartimentos do corpo, como a medula óssea, constituem reservatórios destas células. Em situações de injúria tecidual e guiadas por uma resposta local, essa população de células reparadoras é mobilizada das reservas mais distantes para o sítio da lesão, contribuindo em muitos aspectos para o reparo tecidual.

Embora a proliferação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas tenham sido bem documentadas, pouco é conhecido sobre o componente estromal da medula óssea. O estroma da medula óssea em humanos e animais é de composição heterogênea, contendo número variado de populações celulares, incluindo uma população de células denominadas células-tronco mesenquimais (CTMs) (ZUK et al., 2001). As CTMs são células-tronco não-hematopoiéticas multipotentes, que possuem alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo ossos, cartilagens, tecido adiposo, tendões e músculos (CAMPAGNOLI et al., 2001; ROMANOV et al., 2003), o que torna essas células uma opção promissora para o reparo de defeitos mesodérmicos e o manejo de doenças (ZUK et al., 2001).

Apesar de a medula óssea ser a fonte de células-tronco adultas mais estudada, não significa que é a única. A presença de células multipotentes com extensiva capacidade de auto-renovação tem sido descrita no tecido adiposo (ZUK et al., 2001, 2002), pele (TOMA et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), vasos sanguíneos (SAMPAOLESI et al., 2003), músculos e cérebro (JIANG et al., 2002).

O tecido adiposo, assim como a medula óssea, é derivado do mesoderma embrionário e contém um estroma de suporte, cujo isolamento é de fácil realização. Essas semelhanças levantaram a hipótese de que o tecido adiposo poderia representar uma fonte alternativa de células-tronco no organismo adulto. ZUK et al. (2002) realizaram estudo em humanos com o objetivo de confirmar a existência de células-

tronco no tecido adiposo e comparar o potencial de diferenciação dessas células com o das células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas da medula óssea. Esses autores confirmaram a presença e a capacidade de diferenciação das células-tronco isoladas de lipoaspirados processados humanos, chamadas de células PLA, fenotipicamente muito semelhantes às CTMs, concluindo que o tecido adiposo também é uma fonte de células-tronco adultas.

Enquanto o modelo geral de diferenciação da linhagem mesenquimal das células derivadas do tecido adiposo e da medula óssea são muito semelhantes, algumas diferenças têm sido observadas. Pode-se dizer que as células-tronco provenientes do tecido adiposo são similares, mas não são idênticas aquelas obtidas a partir do estroma medular (FRASER et al., 2008).

ZANG (2004) estudou populações de células-tronco obtidas de três diferentes depósitos de gordura em ratos e observou que elas são morfologicamente diferentes. Também verificou diferenças no número de colônias formadas em cultura e na capacidade de dispersão. A população de células isoladas do depósito gonadal apresentou o menor número de colônias e a maior capacidade de dispersão. Em relação à capacidade de diferenciação, foi observada maior capacidade osteogênica nas células obtidas do depósito inguinal, enquanto a população isolada do depósito retro peritoneal apresentou maior capacidade de diferenciação em músculo liso. Esse estudo levanta a hipótese de que é possível existir fontes de células-tronco predispostas a se diferenciarem em tipos específicos de células.

A primeira etapa visível da diferenciação do embrião se dá no momento que este atinge o estágio de blastocisto, quando se observa duas populações distintas de células, aquelas que dão origem aos tecidos extra-embrionários, como a placenta, e as células da chamada massa celular interna, que originam todos os tecidos do embrião. Estas células podem ser removidas do embrião, colocadas em placa de cultura e, em condições apropriadas, podem se manter indiferenciadas, multiplicando-se indefinidamente em laboratório com preservação do potencial de diferenciação em todos os tipos celulares adultos (PEREIRA, 2008). Estas células são as chamadas células-tronco embrionárias, que apresentam como característica principal a

pluripotência, ou seja, quando re-introduzidas em um embrião possuem a capacidade de retomar o desenvolvimento normal, colonizando diferentes tecidos numa demonstração contundente de sua ampla plasticidade (EVANS & KAUFMAN, 1981). Porém, quando injetadas em animais imunodeficientes, as células-tronco embrionárias têm a capacidade de responder aos diferentes estímulos *in vivo* se diferenciando desordenadamente e levando à formação de tumores que apresentam tipos de tecidos diversos, os teratomas (PEREIRA, 2008).

Segundo LUYTEN (2004), inúmeras oportunidades terapêuticas para o uso de células-tronco adultas podem ser descobertas, no entanto, nesta fase de desenvolvimento das pesquisas sobre o tema, o mais importante é a compreensão dos mecanismos que regulam estas células *in vivo*. O entendimento deve se estender a aspectos mais profundos sobre o recrutamento, proliferação e diferenciação apropriadas, e a reparação morfofuncional local. Percebe-se, então, a necessidade de estudar o isolamento e a expansão das células-tronco em cultivo celular a fim de direcionar *in vitro* a diferenciação das células-tronco em tipos específicos de células antes de serem transplantadas em animais doentes.

As células-tronco de diferentes espécies, como humanos e equinos, já podem ser isoladas e cultivadas *in vitro* (HEGEWALD et al., 2004). As células-tronco mesenquimais do estroma medular, também conhecidas como unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F) são células que aderem a placas de cultura e formam colônias semelhantes a fibroblastos *in vitro* (BITTENCOURT et al., 2006). Esta característica tem despertado interesse em muitos veterinários, que consideram as células-tronco mesenquimais como agentes terapêuticos potenciais para problemas musculoesqueléticos como tendinites, desmites, lesões ósseas e articulares, tão frequentemente encontradas em cavalos atletas (VIDAL et al., 2006).

Alguns autores têm relatado a necessidade de número determinado de células-tronco para promover o reparo de um tecido musculoesquelético lesado. MUSCHLER & MIDURA (2002) estimaram que 70 milhões de células progenitoras fossem necessárias para produzir um centímetro cúbico de osso. Em outros estudos, avaliando-se o reparo de tendões e ligamentos, o número de células-tronco utilizadas mostrou-se também

bastante elevado (SMITH et al., 2003; SMITH & WEBBON, 2005). O primeiro passo na produção de um número de células-tronco mesenquimais suficiente para o tratamento de um tecido lesado passa, primeiramente, pelo conhecimento das características de crescimento destas células em cultura (VIDAL et al., 2006).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho a padronização de técnicas de coleta e isolamento de células-tronco mesenquimais em equinos a partir da medula óssea e de tecido adiposo, a identificação de marcadores de superfície presentes nas células obtidas destas amostras e a caracterização morfológica destas células em cultura, assim como a avaliação do comportamento celular sob diferentes condições de cultivo e a verificação dos efeitos de um fator transformador sobre o crescimento, a diferenciação e morte celular.

REFERÊNCIAS

BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, H. R.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A. P. E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, p.1-6, n.1, 2006.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and Rheumatism**, v.44, p.1928-42, 2001.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, A. G.; KUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. **Blood**, v.98, p.2396-2402, 2001.

EVANS, M.; KAUFMAN, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, p.154-6, 1981.

FRASER, J. K.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. Adipose-derived stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v.449, p.59-67, 2008.

GASPER, P.W. The hemopoietic system. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**, Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap.11, p.63-68.

HEGEWALD, A. A.; RINGE, J.; BARTEL, J.; KRÜGER, I.; NOTTER, M.; BARNEWITZ, D.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. **Tissue and Cell**, v.36, p.431-8, 2004.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, n.10, p.3483-93, 2003.

JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T.; BLACKSTAD, M.; REYES, M.; VERFAILLIE, C. M. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Experimental Hematology**, v.30, n.8, p.896-904, 2002.

KRAUSE, D. S.; THEISE, N. D.; COLLECTOR, M. I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v.105, p.369-77, 2001.

LUYTEN, F. P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.16, p.599-603, 2004.

MUSCHLER, G. F.; MIDURA, R. J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.395, p.66-80, 2002.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, p.1-9, n.1, 2008.

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**, v.21, p.105-10, 2003.

SAMPAOLESI, M.; TORRENTE, Y.; INNOCENZI, A.; TONLORENZI, R.; D'ANTONA, G.; PELLEGRINO, M. A.; BARRESI, R.; BRESOLIN, N.; DE ANGELIS, M. G.; CAMPBELL, K. P.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. **Science**, v.301, n.5632, p.487-92, 2003.

SMITH, R. K. W.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. Isolation and implantation of autologous mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.1, p.99-102, 2003.

SMITH, R. K.; WEBBON, P. M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? **British Journal of Sports Medicine**, v.39, p.582-4, 2005.

TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J.; BARNABÉ-HEIDER, F.; SADIKOT, A.; KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v.3, p.778-84, 2001.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; JOHNSON, J. R.; LOPEZ, M. J.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. **Veterinary Surgery**, v.35, p.601-10, 2006.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-28, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.4279-95, 2002.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE COMPARATIVA DA OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE EQUINOS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO ADIPOSEO E VIABILIDADE CELULAR ANTES E APÓS O CONGELAMENTO.

RESUMO – Devido ao grande interesse pelo uso terapêutico de células-tronco mesenquimais e a escassez de informações sobre estas células na espécie equina, objetivou-se com este trabalho padronizar e comparar as técnicas de coleta e viabilidade celular antes e após o congelamento de células-tronco mesenquimais em equinos obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo. Cinco cavalos adultos foram submetidos à coleta de medula óssea do esterno e, em seguida, de tecido adiposo da região glútea próxima a inserção da cauda. As amostras foram processadas de acordo com métodos já descritos para obtenção de células mononucleares, e o número de células bem como a viabilidade celular foram determinados e comparados. As amostras foram congeladas e a viabilidade celular após o descongelamento foi novamente mensurada e comparada. Verificou-se mediante os resultados obtidos que as técnicas utilizadas neste trabalho para coleta de medula óssea e tecido adiposo em equinos são simples, rápidas e seguras, podendo ser realizadas com os animais em estação e sem o uso de tranquilizantes. A metodologia utilizada para o processamento das amostras permitiu a obtenção de um percentual de viabilidade celular próximo a 95% em ambos os grupos. A viabilidade celular das amostras de tecido adiposo após o descongelamento foi significativamente inferior à de medula óssea.

Palavras-Chave: células-tronco, equinos, medula óssea, tecido adiposo, viabilidade celular.

1. INTRODUÇÃO

Historicamente as células-tronco foram estudadas pela sua importância na diferenciação dos diversos tipos celulares durante a fase embrionária, porém recentemente despertaram grande interesse pelo potencial de exploração clínica no reparo e substituição de tecidos lesados no organismo adulto (HADJANTONAKS & PAPAIONNOU, 2001).

As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se auto-renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo (BITTENCOURT et al., 2006), o que têm atraído a atenção de médicos veterinários para a utilização destas células no tratamento de afecções do aparelho locomotor, tão comuns em cavalos atletas (VIDAL et al., 2006).

A medula óssea é tradicionalmente vista como um órgão composto de dois sistemas principais, o tecido hematopoiético propriamente dito e o estroma de sustentação da hematopoiese. As células do estroma medular, originalmente estudadas devido ao seu papel crítico na formação do microambiente hematopoiético, tornaram-se atualmente o centro da atenção, com a descoberta de sua pluripotencialidade. Resultados recentes apontaram para o potencial de diferenciação não esperado de células do estroma medular em tecidos nervoso e muscular, o que as caracterizam como parte da família de células-tronco somáticas. Estas células existem, após o nascimento, em alguns tecidos que apresentam plasticidade, ou seja, habilidade de se diferenciar em tipos celulares fenotipicamente não encontrados no tecido de origem (BIANCO et al., 2001).

A presença de células multipotentes com extensiva capacidade de auto-renovação também tem sido descrita em outros tecidos do organismo (TOMA et al., 2001). O tecido adiposo constitui uma fonte de células progenitoras de fibroblastos, com capacidade de diferenciação multipotencial, em várias espécies. Na literatura humana, o estudo destas células tem ganhado muita importância devido à facilidade de acesso e possibilidade de obtenção em grandes quantidades. Atualmente, sua aplicação está sendo testada em campos como a cirurgia e a medicina regenerativa (VIDAL et al., 2007).

Em 2002, ZUK et al. confirmaram a presença e a capacidade de diferenciação das células-tronco isoladas de lipoaspirados humanos, observando que estas células são fenotipicamente muito semelhantes às células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea.

Segundo ZUK et al. (2001), a fonte ideal de células-tronco autólogas seria aquela que fosse de fácil obtenção, resultando em mínimo desconforto para o paciente, e capaz de produzir número substancial de células.

Devido ao interesse do uso terapêutico de células-tronco mesenquimais e a escassez de informações sobre estas células na espécie equina, objetivou-se com este trabalho comparar as técnicas de coleta e a viabilidade celular antes e após o congelamento de células-tronco mesenquimais obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo de equinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados cinco equinos machos com idade entre seis e 16 anos e peso variando entre 400 e 500 kg, provenientes da Fazenda do Serviço de Soro Produção do Instituto Butantã, sito na cidade de São Roque- SP. Foram incluídos neste estudo apenas os animais hígidos selecionados após exame clínico geral e que não estavam sendo utilizados nos protocolos de imunização do Instituto.

Cada animal foi submetido inicialmente à coleta de células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea e, em seguida, do tecido adiposo.

2.2. Coleta de células-tronco

As coletas e o processamento celular foram realizados no mesmo dia. Durante o transporte até o laboratório de cultivo celular, as amostras foram mantidas sob refrigeração.

2.2.1. Medula óssea

As CTM da medula óssea foram coletadas a partir do esterno de cada cavalo por meio de punção biópsia aspirativa, com o animal em estação, contido por um cabresto.

A punção foi realizada na linha média ventral, aproximadamente cinco centímetros caudal ao olécrano. O local da biópsia foi tricotomizado e preparado para coleta estéril. A pele e os tecidos adjacentes foram anestesiados mediante infiltração de 5ml de cloridrato de lidocaína¹ a 2% com vasoconstritor. A punção foi realizada utilizando-se mandril de cateter² nº 14G adaptado (foi inserido dentro do mandril uma haste metálica estéril para desobstruir o canal de passagem das células), e a aspiração de medula óssea foi feita com seringa de 20ml contendo 0,2ml de heparina sódica³ (Figura 1).



Figura 1. Coleta de medula óssea do esterno de um cavalo em posição quadrupedal.

¹ Xilestesin. Cristália, Itapira/SP

² Cateter Nipro 14G, Nipro Medical Ltda, Sorocaba/SP.

³ Liquemine. Roche Brasil, Rio de Janeiro/RJ.

2.2.2. Tecido adiposo

As CTM do tecido adiposo foram coletadas da gordura localizada sobre a superfície dorsal do músculo glúteo, próximo à inserção da cauda. O procedimento foi realizado com o animal em estação mantido em tronco de contenção.

A região foi tricotomizada, anestesiada com infiltração local de 5ml de cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor e preparada para coleta estéril. Foi realizada incisão de pele, de aproximadamente 5,0cm, e leve divulsão do tecido subcutâneo para exposição e coleta de amostra de tecido adiposo (Figura 2). Em seguida, a pele foi aproximada com fio de nylon em pontos simples separados.



Figura 2. Ilustração de região glútea de equino após realização de tricotomia (A). Amostra de tecido adiposo sendo retirada da região glútea (B). Envase de tecido adiposo em tubo contendo meio de cultivo RPMI 1640-Cultilab (C).

2.3. Processamento celular e contagem do número de células viáveis

As amostras de tecido adiposo de cada cavalo foram colocadas em placas de Petri estéreis e pesadas utilizando-se balança eletrônica de precisão. Em seguida, foram fragmentadas com o emprego de lâminas de bisturi e colocadas em solução de RPMI⁴ contendo 0,3mg/ml de collagenase⁵ para a digestão do tecido conjuntivo a 37°C por aproximadamente duas horas sob agitação com o auxílio de um agitador magnético (Figura 3).

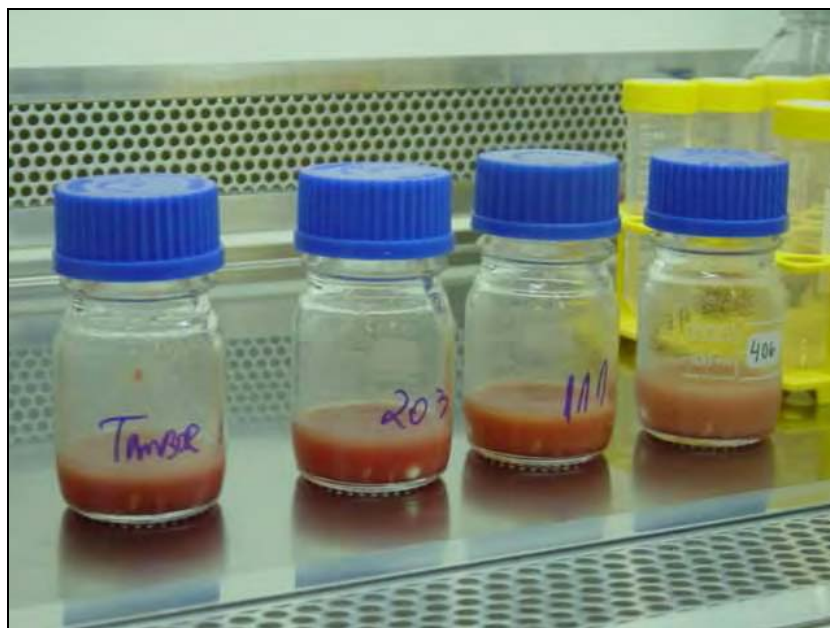


Figura 3. Amostras de tecido adiposo equino após digestão do tecido conjuntivo em solução contendo collagenase.

Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em um filtro de nylon com diâmetro de 100 micras e centrifugada a 300xg por dez minutos a 4°C. O *pellet* recuperado após centrifugação foi ressuspendido em 8 mL de HBSS⁶ (*Hanks Balanced Salt Solution*) e submetido ao método de isolamento de células mononucleares, utilizando-se gradiente de densidade (Ficoll⁷, 1,077g/dl). Com o objetivo de separar os adipócitos das células-

⁴ RPMI 1640. Cultilab, Campinas/SP.

⁵ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

⁶ Solução Balanceada Hanks. Cultilab, Campinas/SP.

⁷ Ficoll-Paque. Science Pro, São Caetano do Sul/SP.

tronco mesenquimais, a fração mononuclear foi obtida na interface Ficoll/meio e foi identificada como CTM-AD (células-tronco mesenquimais do tecido adiposo).

As amostras de aspirado medular também foram diluídas em HBSS na proporção de 1:1 e processadas para o isolamento de células mononucleares como descrito anteriormente (Figura 4) e identificadas como CTM-MO (células-tronco mesenquimais da medula óssea).

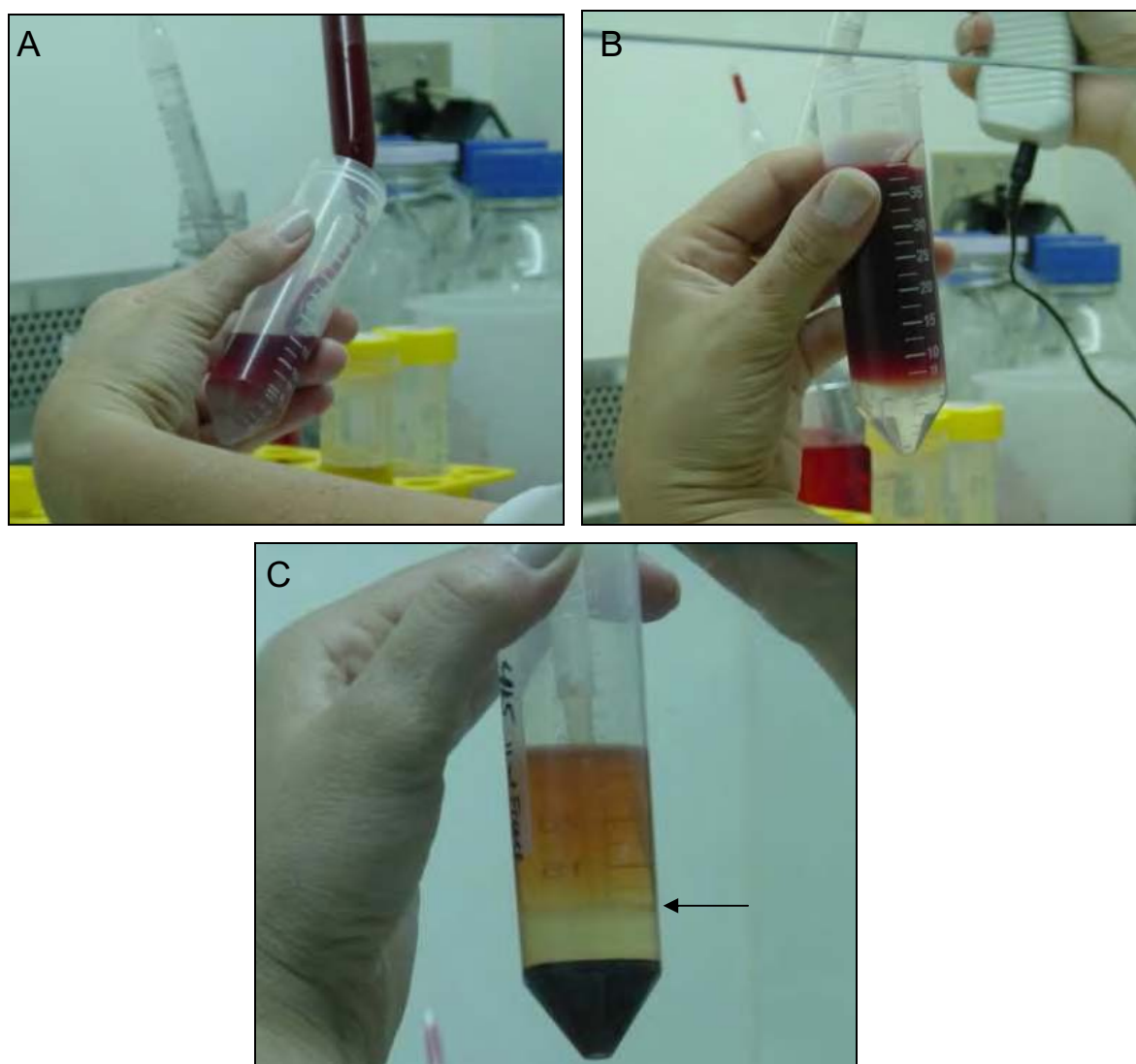


Figura 4. Isolamento de células mononucleares de aspirado medular equino utilizando-se gradiente de densidade com Ficoll. A: amostra de aspirado medular sendo lentamente depositada sobre a camada de Ficoll. B: amostra de medula óssea e Ficoll antes da centrifugação. C: após a centrifugação, a camada de células mononucleares (seta) é aspirada com pipeta.

Após a recuperação da fração mononuclear, as CTM-AD e CTM-MO foram separadamente ressuspensas com 10 ml de HBSS para contagem e determinação da viabilidade, utilizando-se a câmara de Neubauer. O número de células viáveis foi determinado pela técnica de exclusão de células não viáveis coradas pelo Azul de Trypan 1%⁸. Após a contagem, as células foram congeladas em solução criopreservativa, constituída de soro fetal equino⁹ e DMSO¹⁰ a 10%, durante 24 horas a - 80°C, sendo posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido. Após um mês de congelamento, as células foram descongeladas colocando os criotubos rapidamente em banho-maria (37°C). Assim que visibilizado o início do descongelamento, as células foram ressuspensas em meio RPMI a 37°C acrescido a 10% de soro fetal equino. A viabilidade celular foi novamente avaliada após o descongelamento, utilizando-se o corante vital Azul de Trypan.

2.4. Análise estatística

Para a realização dos testes foi utilizado o programa GraphPad InStat 3.0. Os resultados foram submetidos ao teste t de *Student* seguido do teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (VIEIRA, 2004). O limite de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo ZUK et al. (2002), a coleta tradicional da medula óssea em humanos possui algumas limitações, uma vez que se trata de um procedimento frequentemente doloroso e que necessita da realização de anestesia geral ou espinal. Já em cavalos, a medula óssea tem sido utilizada como fonte de células-tronco adultas, e essas células são facilmente adquiridas a partir de aspirados do esterno, tuberosidade coxal e extremidade proximal do úmero (WOSTER et al., 2000).

⁸ GIBCO Invitrogen, São Paulo/SP.

⁹ Bio Nutrientes do Brasil, Barueri/SP.

¹⁰ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

Relativamente à técnica de coleta de medula do esterno em cavalos, enquanto alguns trabalhos destacaram o risco potencial de complicações como pneumotórax e pneumopericárdio, além da posição precária e vulnerável do pesquisador durante a coleta (DURANDO et al., 2006), outros consideraram o procedimento extremamente simples, cuja realização pode ser efetuada apenas com a utilização de tranquilizantes e anestesia local (FORTIER et al., 1998; SMITH et al., 2003). Neste trabalho comprovou-se a facilidade do procedimento, e não se observaram complicações como hematoma, hemorragia ou infecção no local da punção. Adicionalmente, o uso de tranquilizantes não foi necessário devido ao temperamento dócil dos animais utilizados.

Após a introdução da agulha na cavidade medular do esterno, o mandril foi retirado e o aspirado medular foi obtido tracionando-se o êmbolo da seringa. A força de tração necessária para obter-se a amostra variou entre os animais, bem como a quantidade de material coletado (Tabela 1).

Tabela 1. Volume (ml) de aspirado obtido a partir de punção biópsia aspirativa da medula óssea do esterno de cinco equinos e valor médio do grupo. Jaboticabal/SP, 2009.

<i>Animal</i>	<i>Aspirado medular (ml)</i>
1	15,0
2	40,0
3	37,0
4	24,0
5	40,0
<i>Média</i>	31,2 ± 11,2

Em relação à coleta de tecido adiposo, a metodologia adotada neste trabalho foi de execução rápida e fácil. Esta técnica também foi utilizada com sucesso por outros pesquisadores (CARVALHO et al., 2009; COLLEONI et al., 2009; MAMBELLI et al., 2009). Não houve a necessidade de tranquilização dos animais e a anestesia local foi suficiente para impedir qualquer estímulo doloroso. O uso do cloridrato de lidocaína com vasoconstritor visou minimizar o sangramento durante a coleta, evitando

contaminação da amostra. A quantidade de material coletado também foi bastante variável entre os animais (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade (g) de tecido adiposo coletado da região glútea, próxima à inserção da cauda, de cinco equinos e valor médio do grupo. Jaboticabal/SP, 2009.

<i>Animal</i>	<i>Tecido adiposo (g)</i>
1	8,1
2	28,6
3	15,8
4	8,0
5	6,7
<i>Média</i>	13,44 ± 9,2

Segundo SMITH et al. (2003) as células-tronco mesenquimais obtidas a partir da medula óssea de equinos podem ser separadas utilizando-se técnica semelhante à descrita para o isolamento de células-tronco mesenquimais em outras espécies. O método de isolamento de células mononucleares com o emprego de gradiente de densidade Ficoll, utilizado neste trabalho, foi descrito anteriormente por HEGEWALD et al., 2004, bem como a determinação da viabilidade celular utilizando o corante Azul de Trypan e a contagem de células em câmara de Neubauer (BITTENCOURT et al., 2006).

Também a metodologia utilizada neste trabalho para obtenção de células-tronco mesenquimais a partir do tecido adiposo de equinos foi semelhante à utilizada por ZUK et al. (2001) em humanos e mostrou-se muito eficiente, uma vez que se obteve ótimo percentual de viabilidade celular após o processamento das amostras (Tabela 3). As amostras de medula óssea também apresentaram percentual de viabilidade celular próximo a 95%, não havendo diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3. Porcentagem de viabilidade celular obtida após o processamento das amostras de medula óssea (CTM-MO) e tecido adiposo (CTM-AD) em equinos. Jaboticabal/SP, 2009.

<i>Animal</i>	<i>% Viabilidade CTM-MO</i>	<i>% Viabilidade CTM-AD</i>
1	94	100
2	93	92
3	96	100
4	94	88
5	96	100
<i>Média</i>	94,6 ± 1,3	96 ± 5,6

WORSTER et al. (2000) trabalhando com aspirado medular de três cavalos, embora tenham utilizado um volume inicial fixo de 30 ml, obtiveram número total de células bastante diferente entre os animais ($18,8 \times 10^6$, $1,87 \times 10^6$ e $4,85 \times 10^6$). A razão para a variabilidade individual ainda é desconhecida, mas é possível que a idade e a massa corporal possam interferir no número de células-tronco presente nos tecidos (VIDAL et al., 2007). A idade tem sido relatada como inversamente proporcional ao número de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em humanos, mas ainda existem conflitos na literatura, pois AUST et al. (2004) não comprovaram esta correlação.

Segundo ZUK et al. (2002), o tecido adiposo é uma importante fonte alternativa de células-tronco mesenquimais, uma vez que a obtenção destas células a partir da medula óssea é, em geral, muito baixa. O número de células obtidas neste trabalho a partir de 1,0 mL de medula óssea e 1,0 g de tecido adiposo em equinos está apresentado na Tabela 4. Apesar de não ser possível a análise estatística desses dados, uma vez que se trata de tecidos com densidades diferentes, observa-se que o número de células adquiridas a partir da medula óssea foi superior em relação ao tecido adiposo. No entanto, é importante lembrar que este número representa a população total de células mononucleares e que, na medula óssea, grande parte desta população é constituída de células-tronco hematopoiéticas. Estes resultados estão de acordo com os relatados por VIDAL et al. (2007), que obtiveram número de células mononucleares

nas amostras de aspirado medular ($6,4 \times 10^6$) superior aquele encontrado no tecido adiposo (3×10^5).

Tabela 4. Número de células mononucleares viáveis obtidas da medula óssea (CTM-MO) e tecido adiposo (CTM-AD) de equinos. Jaboticabal/SP, 2009.

<i>Animal</i>	<i>Células/ml CTM-MO</i>	<i>Células/g CTM-AD</i>
1	$1,12 \times 10^6$	$6,17 \times 10^5$
2	$0,34 \times 10^6$	$8,39 \times 10^5$
3	$2,16 \times 10^6$	$1,27 \times 10^5$
4	$2,03 \times 10^6$	$2,00 \times 10^5$
5	$3,78 \times 10^6$	$5,97 \times 10^5$
Média	$1,89 \times 10^6 \pm 1,29$	$4,76 \times 10^5 \pm 3,01$

Verificou-se que, após o descongelamento das amostras, a porcentagem de viabilidade celular diminuiu em ambos os grupos. Neste momento, a viabilidade celular média das amostras obtidas a partir do tecido adiposo foi menor que a encontrada nas amostras provenientes de medula óssea (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de viabilidade de células da medula óssea (CTM-MO) e células do tecido adiposo (CTM-AD) obtida após o descongelamento das amostras. Jaboticabal/SP, 2009.

<i>Animal</i>	<i>% Viabilidade CTM-MO</i>	<i>% Viabilidade CTM-AD</i>
1	83	81
2	88	55
3	82	77
4	91	60
5	86	50
Média	$86 \pm 3,28$	$64,6 \pm 12,2^*$

*indica diferença significativa ($p < 0,002$ Teste t de *Student* seguido do não-paramétrico de *Mann-Whitney*)

Sabe-se que o processo de criopreservação induz danos à estrutura celular (CURY & SOUZA, 2007) e o objetivo dos vários protocolos de criopreservação é minimizar a injúria celular durante o processo de congelamento e descongelamento. Esta injúria pode resultar da extensiva desidratação celular e/ou devido à formação

intracelular de cristais de gelo. Além disso, um alto grau de destruição celular está relacionado à liberação de calor de fusão observada quando o período de transição entre as fases líquida e sólida se prolonga excessivamente (BALINT et al, 1999).

Para que o processo de criopreservação tenha sucesso, é necessário o uso de um agente crioprotetor que diminua o gradiente osmótico e a diferença de pressão de vapor entre os compartimentos intra e extracelular. O dimetil sulfóxido (DMSO) tem sido comumente utilizado em diferentes concentrações como agente crioprotetor. Embora o procedimento de criopreservação de células-tronco já seja utilizado rotineiramente, alguns problemas relacionados à velocidade de congelamento e a escolha do agente crioprotetor e sua concentração ainda não estão totalmente resolvidos (BALINT et al, 1999).

Poucos estudos com células-tronco adultas comparam a porcentagem de viabilidade celular antes e após congelamento. VIDAL et al. (2006), trabalhando com células-tronco mesenquimais derivadas de aspirado medular de equinos, obtiveram 64% de viabilidade celular após o descongelamento. No presente trabalho, o valor obtido neste tipo de amostra foi de 86% e a porcentagem encontrada nas amostras de CTM-AD, embora tenha sido inferior às de CTM-MO, foi semelhante à descrita por aqueles autores.

Alguns trabalhos têm apontado para a diferença de viabilidade celular conforme a substância criopreservativa utilizada. KOICHI et al. (2008) avaliaram sete diferentes protocolos para criopreservação de células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongos e verificaram as menores porcentagens de viabilidade celular quando foi utilizado DMSO a 10% ou meio de criopreservação com glicerol. Estes autores sugerem a utilização de substâncias criopreservativas não tóxicas às células como a trealose (um dissacarídeo de glicose) ao invés do DMSO que apresenta maior toxicidade.

A variação de viabilidade celular após descongelamento observada neste trabalho entre as amostras de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e do tecido adiposo pode ser devido a uma diferença de sensibilidade à substância criopreservativa utilizada, e testes comparativos adicionais devem ser realizados para complementação deste estudo.

4. CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas neste trabalho para coleta de medula óssea e tecido adiposo em equinos são simples, rápidas e seguras, podendo ser realizadas com os animais em estação e sem o uso de tranquilizantes em cavalos dóceis.

É possível obter-se um percentual de viabilidade celular de 95% após o processamento das amostras para obtenção de células mononucleares utilizando-se gradiente de densidade Ficoll.

O processo de criopreservação de células-tronco mesenquimais de equinos utilizando DMSO a 10% como agente crioprotetor reduz significativamente a viabilidade celular, principalmente nas amostras de tecido adiposo.

5. REFERÊNCIAS

AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S. J. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. **Cytotherapy**, v.6, p.7-14, 2004.

BALINT, B.; IVANOVIC, Z.; PETAKOV, M.; TASESKI, J.; JOVEIE, G.; STOJANOVIE, N.; MILENKOVIE, P. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. **Bone Marrow Transplantation**, v.23, p.613-19, 1999.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. **Stem Cells**, v.19, n.3, p.180-92, 2001.

BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, H. R.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A. P. E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.1, p.1-6, 2006.

CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of

mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, xxx (2009) xxx-xxx.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, xxx (2009) xxx-xxx.

CURY, C. C.; GUARITA-SOUZA, L. C. The cultivated bone marrow-derived mesenchymal stem cells viability analysis after cryopreservation : experimental study in rats. **Biology Studies**, v.29, n.66, p.1691, 2007.

DURANDO, M.; ZARUCCO, L.; SCHAEER, T. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. **Equine Veterinary Education**, v.18, p.75-8, 2006.

FORTIER, L. A.; NIXON, A. J.; WILLIAMS, J.; CHRISTINA, S. C. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.9, p.1182-7, 1998.

HADJANTONAKS, A. K.; PAPAIONNOU, V. E. The stem cells of early embryos. **Differentiation**, v.68, p.156-66, 2001.

HEGEWALD, A. A.; RINGE, J.; BARTEL, J.; KRÜGER, I.; NOTTER, M.; BARNEWITZ, D.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. **Tissue and Cell**, v.36, p.431-8, 2004.

KOICHI, O.; HIROFUMI, N.; HIROSHI, Y.; TAKAMICHI, M.; RYUJI, K.; YASUO, K.; MINORU, U.; SHUJI, H. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. **Cell Transplantation**, v.17, n.1-2, p.35-41, 2008.

MAMBELLI, L. I.; SANTOS, E. J. C; FRAZÃO, M. S.; CHAPARRO, M. S.; KERKIS, A.; ZOPPA, A. L. V.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering: Part C**, v.15, n.1, p.87-94, 2009.

SMITH, R. K. W.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. Isolation and implantation of autologous mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.1, p.99-102, 2003.

TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J.; BARNABÉ-HEIDER, F.; SADIKOT, A.; KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v.3, p.778-84, 2001.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; JOHNSON, J. R.; LOPEZ, M. J.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. **Veterinary Surgery**, v.35, p.601-10, 2006.

VIDAL, M. A.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, p.613-22, 2007.

VIEIRA, S. **Biostatística – tópicos avançados**. 2ªed. São Paulo: Campus, 2004, 232p.

WORSTER. A. A.; NIXON, A. J.; BROWER-TOLAND, B. D.; WILLIAMS, J. Effect of transforming growth factor β 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.9, p.1003-10, 2000.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-28, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.4279-95, 2002.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE EQUINOS OBTIDAS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO ADIPOSEO EM DOIS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CELULAR.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi estudar as características morfológicas e imunofenotípicas de células-tronco mesenquimais de equinos mantidas em dois meios de cultura diferentes. Cinco cavalos adultos foram submetidos à coleta de medula óssea do esterno e, em seguida, de tecido adiposo da região glútea próxima a inserção da cauda. As amostras foram processadas para o isolamento de células mononucleares e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino ou em meio AIM-V. As culturas foram observadas uma vez por semana em microscópio de luz invertida, com o intuito de se realizar análise qualitativa que consistiu na descrição tanto da morfologia das células como do aspecto geral do cultivo celular. As unidades formadoras de colônia (CFU) foram contadas nos dias cinco, 15 e 25. A primeira análise imunofenotípica foi realizada no terceiro dia de cultivo primário, antes do descarte das células sobrenadantes, ou seja, ainda com as células totais e repetida nos 18º e 37º dias de cultivo. Os marcadores de superfície testados foram CD11c, CD14, CD4, CD8, CD3, CD45, CD34 e STRO-1. Durante a primeira semana de cultivo, foram observadas diferenças entre as amostras de mesma natureza mantidas em meios de cultura diferentes. O número de colônias foi significativamente maior nas amostras de medula óssea em relação às amostras de tecido adiposo. A caracterização imunofenotípica da população de células em cultivo se modificou no decorrer do tempo.

Palavras-Chave: células-tronco mesenquimais, equinos, medula óssea, tecido adiposo, imunofenotipagem.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, têm-se trabalhado na busca da caracterização morfofuncional das células-tronco na espécie humana, com o intuito de otimizar sua aplicação no tratamento de doenças. No entanto, em medicina veterinária, o conhecimento sobre estas células ainda é bastante limitado e elas estão sendo utilizadas com a hipótese de que suas características essenciais, como tempo de multiplicação e potencial de diferenciação, sejam as mesmas para todas as espécies (VIDAL et al., 2007). Porém, segundo FRASER et al. (2008), pode-se dizer que células-tronco provenientes do tecido adiposo e da medula óssea de um mesmo indivíduo são similares, mas não são idênticas, pois se observam algumas diferenças no modelo geral de diferenciação.

As células-tronco têm sido largamente utilizadas por médicos veterinários na clínica de equinos, fazendo parte do tratamento de lesões do sistema locomotor como tendinites e desmites. Entretanto, ainda são desconhecidos fundamentos básicos referentes à caracterização dessas células, sejam de origem medular ou adiposa, e há poucas publicações a respeito de quais são os marcadores de membrana que identificam as células-tronco mesenquimais na espécie equina.

Uma das formas de avaliação imunofenotípica e quantificação das células-tronco mesenquimais é a análise por meio da citometria de fluxo (GROTO & NORONHA, 2003), também chamada de separação de células ativadas por fluorescência, ou FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter (ALBERTS et al., 2004). A citometria de fluxo é um recurso emergente na medicina veterinária que permite análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (NAKAGE et al., 2005).

As células são marcadas com anticorpos monoclonais, acoplados a fluorocromos (reagentes fluorescentes), específicos para detecção de moléculas de superfície e, em seguida, introduzidas em uma câmara de fluxo vibratória onde cada célula é avaliada com relação ao tamanho, granularidade interna e intensidade de fluorescência para a detecção de diferentes antígenos de superfície (imunofenotipagem). A imunofenotipagem consiste na separação, classificação e quantificação de populações celulares distintas com base na expressão de diferentes

antígenos de superfície marcados com anticorpos monoclonais fluorescentes específicos (NAKAGE et al., 2005).

Sabe-se que em humanos, as células-tronco hematopoiéticas, precursoras mielóides do endotélio e de linhagens mielocíticas, apresentam o antígeno CD34 na sua superfície (NAKAYAMA et al., 2007). Esta glicofosfoproteína pertence à família das sialomucinas, possui peso molecular variando entre 90 e 116 kDa e é encontrada apenas em células nos estágios iniciais de diferenciação. A grande importância na utilização deste marcador para identificação de células precursoras está relacionada ao fato de que sua expressão não ocorre em células maduras (CHENG et al., 1996).

As células mesenquimais oriundas da medula óssea humana expressam CD105, SH3, STRO-1 e CD13, marcadores importantes para sua identificação, e são CD45 negativas isto é, não expressam o marcador CD45, reconhecido marcador de células da linhagem hematopoiética (ULLOA-MONTOYA et al., 2005).

Além da caracterização imunofenotípica, é também importante conhecer as características morfológicas das células-tronco mesenquimais de equinos, bem como o seu comportamento em diferentes meios de cultura. No cultivo de células-tronco se buscam três objetivos principais, a saber, a capacidade de sustentação do potencial de auto-renovação das células, manutenção da capacidade de diferenciação e resistência a criopreservação (ULLOA-MONTOYA et al., 2005).

As células-tronco mesenquimais aderem à placa de cultura, à semelhança do que fazem os fibroblastos *in vitro* e formam colônias celulares ou CFU (*Colony Forming Units*) (BITTENCOURT et al., 2006). As colônias são formadas a partir de uma única célula em suspensão, e quando plaqueadas em altas concentrações, formam uma monocamada celular no substrato (KREBSBACH et al., 1999).

Por aderirem à placa de cultivo, as células-tronco mesenquimais, que compõem grande parte do estroma medular, podem ser isoladas e separadas das células-tronco hematopoiéticas não aderentes, mediante repetidas lavagens (MURAGLIA et al., 2003).

Os primeiros trabalhos com culturas de tecidos foram realizados com fluidos orgânicos de animais, como a linfa. Quando EAGLE (1955) elaborou um meio de cultura básico contendo aminoácidos, carboidratos, vitaminas e minerais, notou que a

suplementação do meio com fluidos orgânicos ainda era necessária, uma vez que tais fluidos apresentavam fatores indefinidos, mas essenciais para o crescimento celular. A suplementação do meio de cultura básico com 20% de soro animal foi amplamente utilizada. Devido à presença de fatores de crescimento e pequena quantidade de gamaglobulina, o soro fetal bovino (SFB) é um dos mais utilizados. Sua concentração no meio de cultivo é de 10%, embora possa ser incrementada ou diminuída dependendo do cultivo (GONÇALVES, 2002).

Dentre as vantagens da utilização do SFB temos, a saber, a presença da maioria dos fatores necessários para a proliferação e manutenção das células, eficácia em diferentes tipos de cultivos celulares e ação tampão, inibindo efeitos adversos como a mudança de pH. Por outro lado, a adição de SFB ao meio pode apresentar algumas desvantagens tais como custo, disponibilidade, origem e qualidade, além do risco de contaminação por bactérias, fungos e vírus (GONÇALVES, 2002).

Muitos outros meios de cultivo celular foram desenvolvidos a partir do meio básico de Eagle como, por exemplo, o meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com o acréscimo de maior quantidade de vitaminas e aminoácidos. O DMEM foi utilizado pela primeira vez para cultivar células embrionárias de ratos e, é atualmente empregado no cultivo de várias linhagens celulares de mamíferos, principalmente aquelas que crescem como camadas aderentes. No entanto, para que ocorra o crescimento celular utilizando-se o meio DMEM, ainda é necessária a suplementação com soro fetal bovino (MORGAN & DARLING, 1995).

A interferência provocada por fatores desconhecidos presentes no SFB tem levado ao emprego cada vez maior de alguns meios de cultivo sem a adição de soro. Entre esses novos meios, encontra-se o AIM-V da GIBCO. Entretanto, muitas vezes, o emprego de meios sem utilização de soro requer adição de suplementos específicos, que não se tem determinado com precisão. Ainda que alguns tipos de células possam crescer em um meio sem soro, algumas características podem ser afetadas negativamente (MORGAN & DARLING, 1995).

Assim, diante da ausência de trabalhos que indiquem a caracterização do tipo celular conhecido e utilizado como célula-tronco mesenquimal equina, o objetivo do

presente trabalho foi estudar as características morfológicas e imunofenotípicas de células mononucleares coletadas da medula óssea e do tecido adiposo de equinos e mantidas em diferentes meios de cultura na presença ou não de soro fetal bovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste ensaio foram coletadas da medula óssea do esterno e do tecido adiposo da região glútea de cinco cavalos adultos, e processadas para o isolamento de células mononucleares, utilizando-se gradiente de densidade (Ficoll¹, 1,077g/dl). As células foram congeladas em solução criopreservativa e armazenadas em nitrogênio líquido durante um mês.

2.1. Cultivo primário e sub-cultivo de células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-AD) de cada cavalo foram descongeladas e imediatamente incubadas em frascos de cultivo celular de 25 cm² na concentração inicial de 5 x 10⁵ células/ml em um volume final de 3ml de RPMI² e em duplicata. As células foram mantidas em incubadora a 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

Após 72 horas de incubação, ou seja, de cultivo primário, as células não-aderentes foram removidas, lavando-se as garrafas com uma solução de *Hanks*³ livre de Ca²⁺ e Mg²⁺. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizada solução de tripsina⁴ a 0,25% acrescida de EDTA⁵ (0,01%) por 5 minutos ou até a visibilização do total desprendimento das células do fundo das garrafas. Para inibir a ação da tripsina as células foram ressuspensas em meio de cultivo RPMI-1640 contendo soro fetal bovino⁶ a 10% (SFB) e o sub-cultivo celular ocorreu em placa de 24 poços, contendo cada poço 1x10⁴ células/ml em um volume total de 1,0ml de meio DMEM⁷ acrescido de

¹ Ficoll-Paque. Amersham, São Paulo/SP.

² RPMI 1640. Cultilab, Campinas/SP.

³ Solução Balanceada Hanks. Cultilab, Campinas/SP.

⁴ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

⁵ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

⁶ Cultilab, Campinas/SP.

⁷ Cultilab, Campinas/SP.

10% de SFB ou meio AIM-V⁸ sem SFB. As replicações celulares ou passagens foram realizadas sempre que as células atingiram confluência de 90%, utilizando solução de tripsina/EDTA conforme descrito acima e, na quarta passagem, as células foram transferidas dos poços para garrafas de 25cm² e incubadas nos meios de cultivo celular supracitados.

2.2. Análise Morfológica e das Unidades formadoras de colônia (CFU)

As culturas de células-tronco foram observadas uma vez por semana em microscópio de luz invertida, com o intuito de se realizar a análise qualitativa. Esta análise consistiu na descrição das características morfológicas das células e do aspecto geral do cultivo celular.

O número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi obtido contando-se o número de agrupamentos celulares, sendo que o agrupamento de cinco ou mais células foi considerado como uma colônia. A contagem foi realizada nos dias cinco, 15 e 25 do sub-cultivo, observando-se cinco campos aleatórios por garrafa de cultura de cada animal.

As fotomicrografias das CFU foram obtidas utilizando-se um Fotomicroscópio (Olympus) acoplado a um microscópio invertido (AxioVert, Zeiss) equipado com câmera fotográfica de 35 mm e filme Kodacolor Gold 100 (Kodak[®]).

2.3. Análise imunofenotípica

Conforme citado anteriormente, as amostras foram mantidas em dois meios de cultivo diferentes, no entanto, a análise imunofenotípica ocorreu apenas com as amostras que apresentaram melhores características durante o cultivo celular.

No terceiro dia de cultivo primário, antes do descarte das células sobrenadantes e do início do sub-cultivo, ou seja, ainda com as células totais, realizou-se a primeira análise imunofenotípica, que foi repetida na terceira e décima passagem, no 18º e 37º dia de cultivo, respectivamente. No momento da replicação celular, foi realizada a contagem do número de células de cada amostra e 8×10^5 células foram utilizadas para

⁸ GIBCO Invitrogen, São Paulo/SP.

a análise imunofenotípica. As CTM-AD e CTM-MO foram lavadas e ressuspensas a uma concentração de 1×10^5 células em 100µl/poço de tampão de citometria (PBS⁹ contendo 0,5% de soroalbumina bovina¹⁰ e 0,02% de azida sódica¹¹). Após outro ciclo de lavagem, as células foram ressuspensas em tampão e marcadas com os anticorpos monoclonais para as seguintes moléculas de superfície: CD11c¹² (marcador de células da linhagem mielóide, monócitos, macrófagos e células dendríticas), CD14¹³ (marcador de monócitos e macrófagos), CD4¹⁴ (marcador de linfócitos T), CD8¹⁵ (marcador de linfócitos T), CD3¹⁶ (marcador de linfócitos T), CD45¹⁷ (marcador de células da linhagem hematopoiética), CD34¹⁸ (marcador de células-tronco hematopoiéticas humanas) e STRO-1¹⁹ (marcador de células-tronco mesenquimais humanas). Após incubação por 20 minutos a 4°C e no escuro, as células foram lavadas duas vezes em tampão para citometria (100µL/poço). As células foram então ressuspensas em 150µL de tampão para citometria contendo 2% de paraformaldeído²⁰, para fixação das células. A seguir foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur-Becton & Dickinson), analisando-se 10.000 eventos por reação. Para a análise dos resultados foi utilizado o “software” CellQuest (BD).

A imunofenotipagem das células mantidas *in vitro* foi realizada analisando a frequência dos marcadores de membrana.

2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos na contagem de CFU foram analisados pelo teste “t” de *Student* e os resultados da análise imunofenotípica foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Bonferroni (VIEIRA, 2004). Para a realização dos testes foi

⁹ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

¹⁰ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

¹¹ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

¹² Especificidade Anti-humano CD11c, Clone HL3, marcação FITC, BD Biosciences, São Paulo/SP.

¹³ Especificidade Anti-humano CD14, Clone M5E2, marcação FITC, BD Biosciences, São Paulo/SP.

¹⁴ Especialidade Anti-equino CD4, Clone CVS4, não conjugado, Serotec, Oxford, UK.

¹⁵ Especialidade Anti-equino CD8, Clone CVS8, não conjugado, Serotec, Oxford, UK.

¹⁶ Especialidade Anti-equino CD3, Clone CD3-12, não conjugado, Serotec, Oxford, UK.

¹⁷ Especialidade Anti-humano CD45, Clone 136-4B5 (IV WS), marcação PE, FK Biotec, Porto Alegre/RS.

¹⁸ Especialidade Anti-humano CD34, Clone ICO 115 (IV WS), marcação PE, FK Biotec, Porto Alegre/RS.

¹⁹ Especialidade Anti-humano STRO-1, Clone PAD Stro-1, não conjugado, Invitrogen, São Paulo/SP.

²⁰ Quiminvest, Rio de Janeiro/RJ.

utilizado o programa GraphPad InStat 3.0. O limite de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Morfológica

No início das avaliações morfológicas (dia zero), as amostras de CTM-AD e de CTM-MO apresentaram características semelhantes, com células arredondadas de diferentes tamanhos e formatos bastante heterogêneos, conforme ilustra a Figura 1.

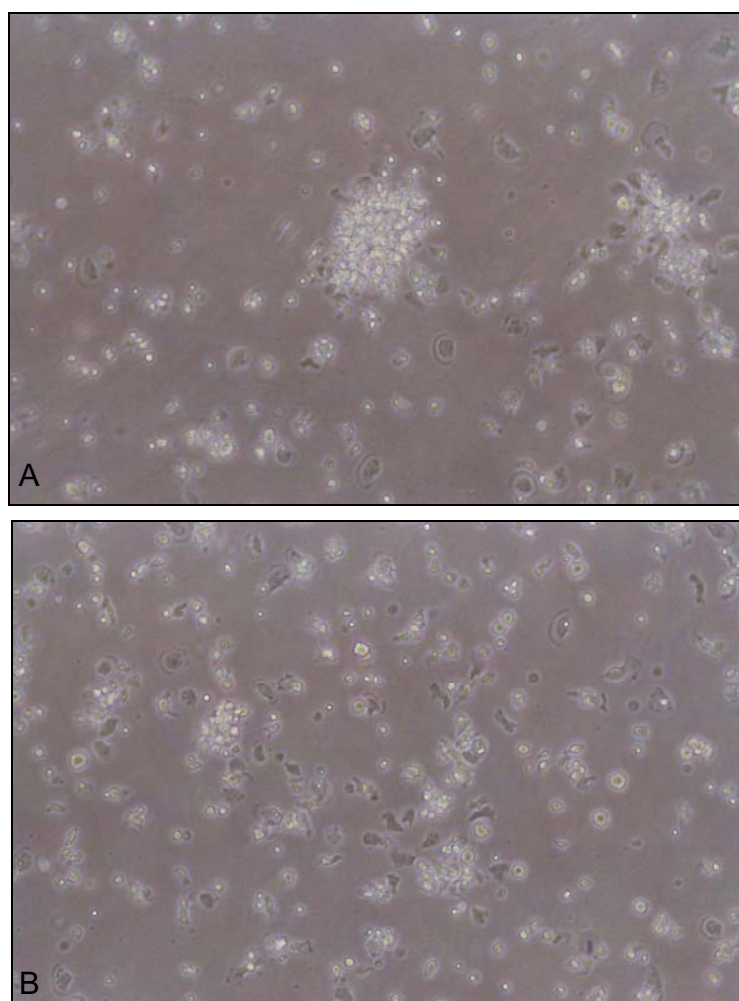


Figura 1. Fotomicrografias de células no início da cultura (dia zero) em aumento de 10x. (A) células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) de equino. (B) células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de equino.

No terceiro dia de cultivo, após a retirada das células não aderentes, observou-se nas amostras de CTM-AD uma população celular fusiforme e firmemente aderida, enquanto nas amostras de CTM-MO, a população celular que aderiu à placa, apresentou formato arredondado e menor número de células (Figura 2).

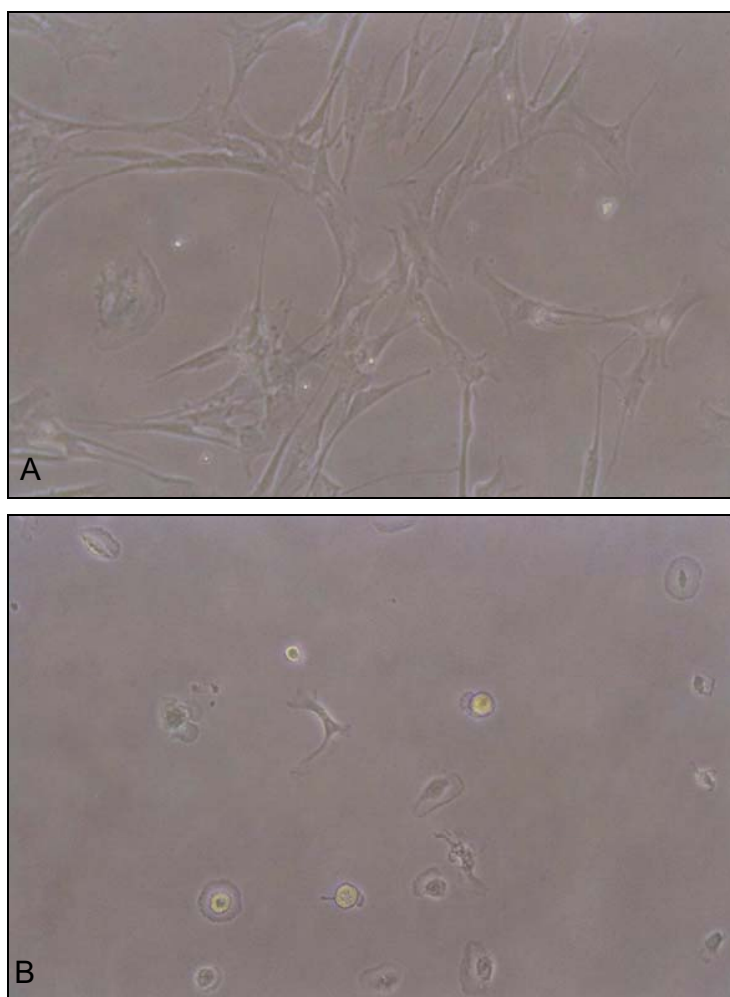


Figura 2. Ilustrações fotográficas onde se observa em A: cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) de equino e em B: cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de equino no terceiro dia de cultivo. Aumento de 20x.

Durante a primeira semana de cultivo foi possível perceber diferenças entre as culturas mantidas em meio DMEM (contendo 10% de SFB) e as mantidas em AIM-V.

Estas diferenças foram visíveis no sétimo dia de cultura e estão ilustradas nas Figuras 3 e 4. As CTM-AD, mantiveram o formato predominantemente fusiforme e apresentaram maior celularidade em meio de cultura DMEM quando comparadas com as células cultivadas em meio AIM-V. Entretanto, observou-se nas culturas de CTM-MO, uma população celular aderida, de formato arredondado, com maior quantidade de células e maior refringência em meio AIM-V.

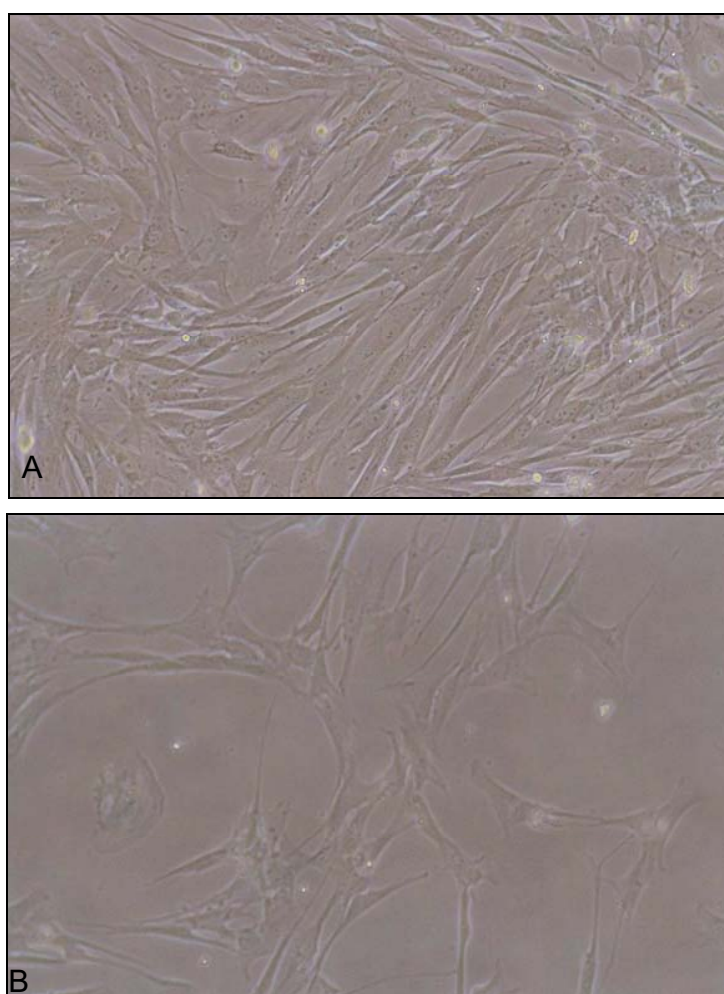


Figura 3. Ilustrações fotográficas de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo (CTM-AD) de equino no sétimo dia de cultivo. A: em meio DMEM. B: em meio AIM-V. Aumento de 20x.

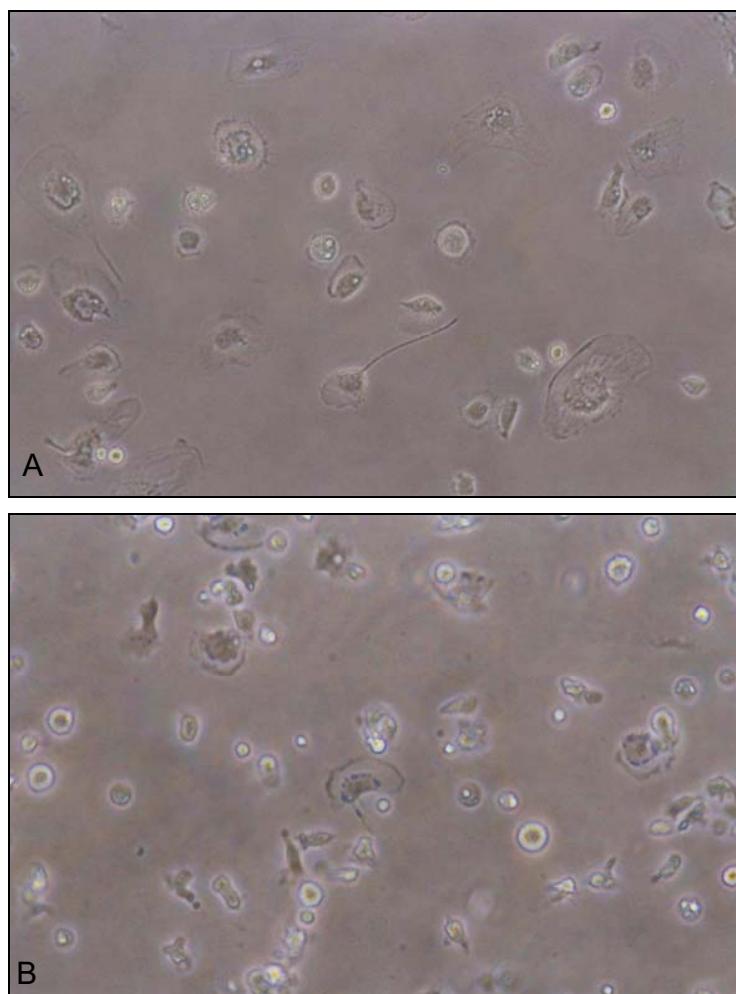


Figura 4. Ilustrações fotográficas de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea (CTM-MO) de equino no sétimo dia de cultivo. A: em meio DMEM. B: em meio AIM-V. Aumento de 20x.

A partir do décimo quarto dia de cultivo não foram mais encontradas diferenças entre os dois meios de cultura. As CTM-AD mantiveram o formato fusiforme e apresentaram proliferação desorganizada. Observou-se nas amostras de CTM-MO a presença de células de aspecto fusiforme e a formação de colônias ou agregados celulares (Figura 5).

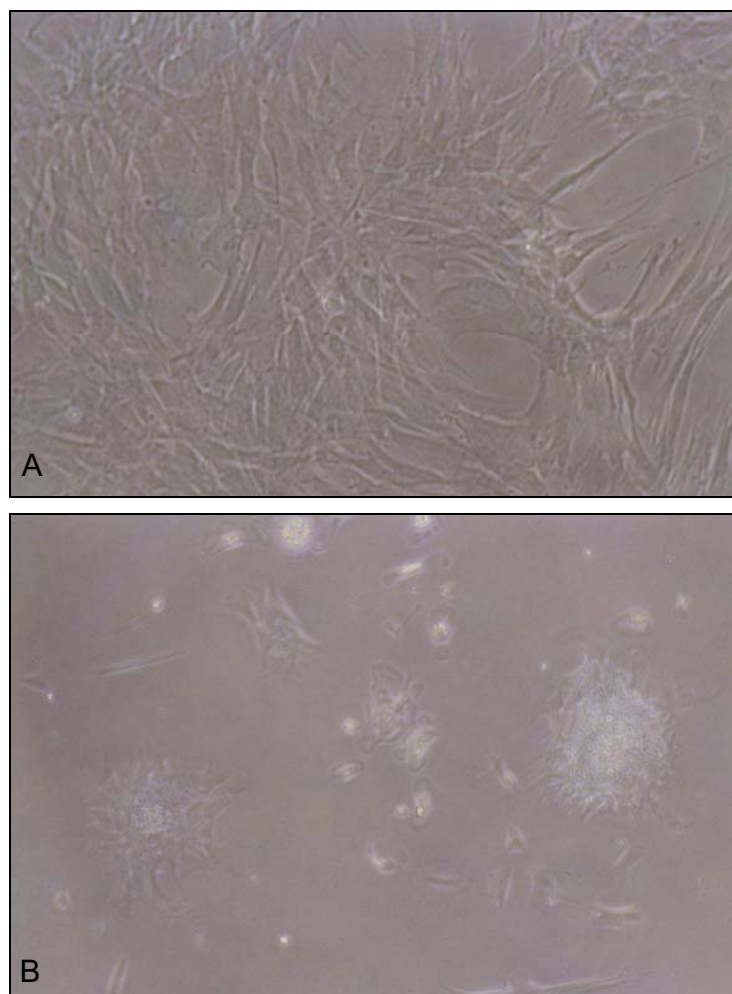


Figura 5. Ilustrações fotográficas onde se observa em A: cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) de equino em meio DMEM e em B: cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de equino em meio AIM-V no décimo quarto dia de cultivo em aumento de 20x.

Com vinte e um dias de cultivo, observou-se nas amostras de CTM-AD células fortemente aderidas, de aspecto fusiforme e com proliferação organizada. Nas culturas de CTM-MO, observou-se maior refringência e a presença de células de formas arredondadas e células fusiformes (Figura 6).

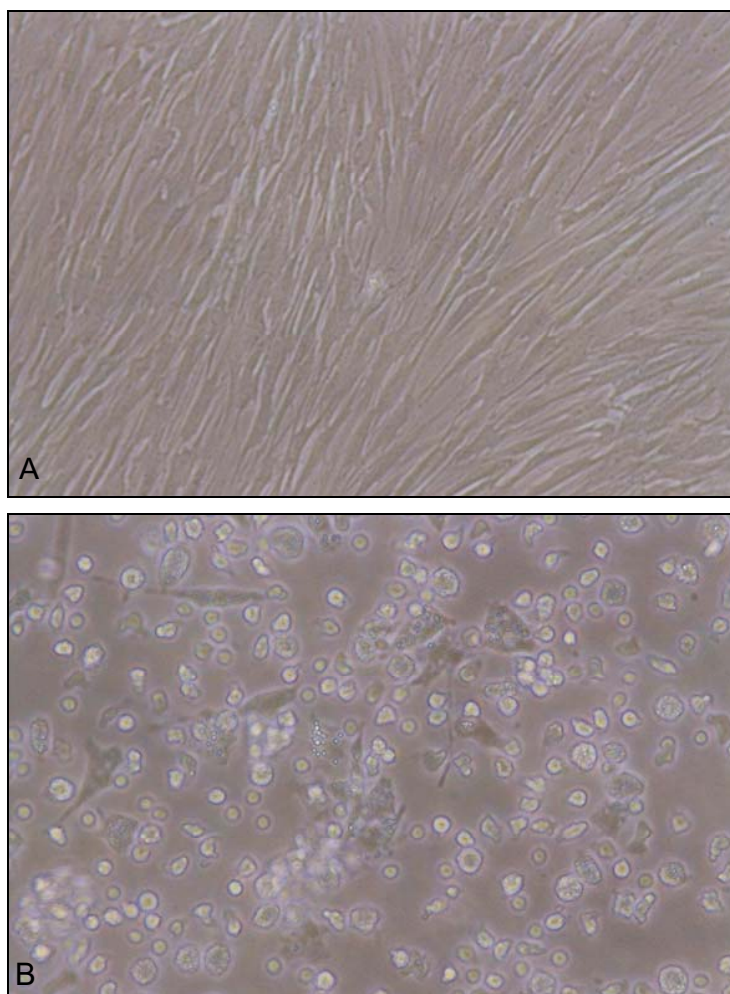


Figura 6. Ilustrações fotográficas onde se observa em A: cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) de equino e em B: cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de equino com 21 dias de cultivo em aumento de 20x.

A última avaliação morfológica foi realizada com trinta e dois dias de cultivo, quando as CTM-AD apresentaram as mesmas características da avaliação anterior e nas culturas de CTM-MO foi verificada a predominância de células fusiformes aderidas (Figura7).

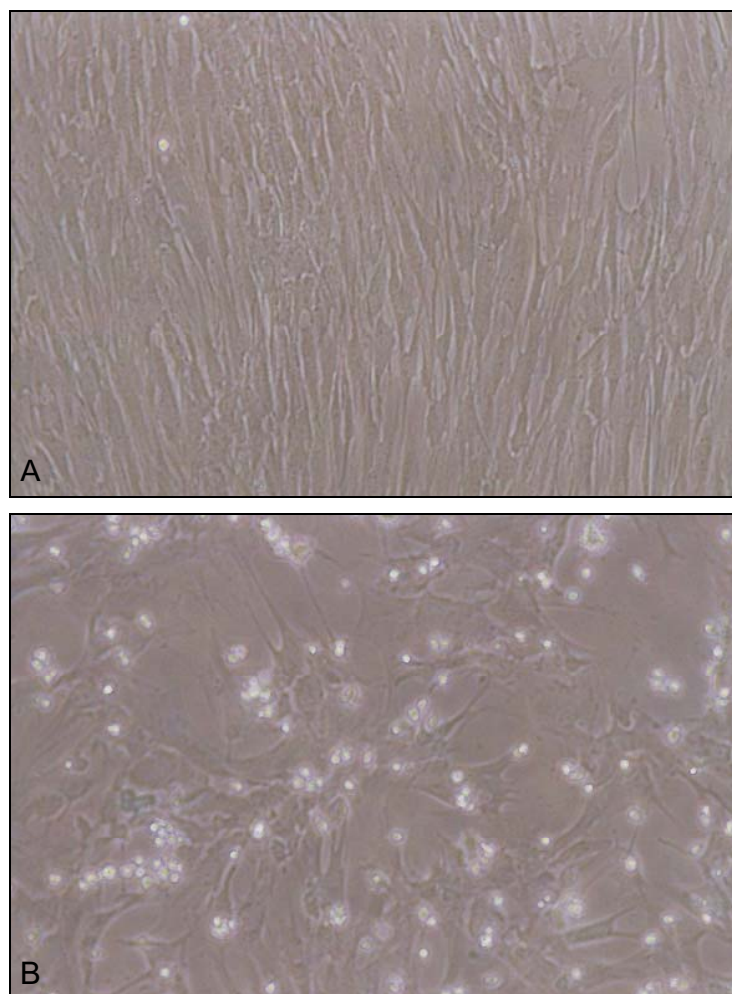


Figura 7. Ilustrações fotográficas onde se observa em A: cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) de equino e em B: cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de equino com 32 dias de cultivo em aumento de 20x.

Visando evitar o potencial risco de exposição de pacientes humanos às células cultivadas na presença de soro fetal bovino (SFB), alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos em busca de um suplemento que o substitua (BIEBACK et al., 2009), pois segundo os resultados de PAL et al. (2009) a presença do soro é essencial para manter e expandir a cultura de células-tronco mesenquimais. No presente trabalho, apesar de as amostras provenientes do tecido adiposo apresentarem maior celularidade

em meio DMEM suplementado com SFB nas primeiras duas semanas, a partir deste momento não se verificou mais diferença em relação às amostras mantidas em meio AIM-V sem SFB, sugerindo que este pode ser uma alternativa para a cultura de células visando transplantes.

Em relação à expansão celular, foi observado no decorrer do cultivo que as amostras de CTM-AD sempre atingiram a confluência de 90% antes das amostras de CTM-MO, de modo que as replicações celulares de CTM-AD ocorreram a intervalos médios de três dias, enquanto que de CTM-MO ocorreram a cada cinco dias aproximadamente. Estas observações corroboram os achados de COLLEONI et al. (2009) indicando que, em equinos, as células provenientes do tecido adiposo apresentam maior capacidade de proliferação em cultura que as células obtidas da medula óssea. Resultados semelhantes foram encontrados por COWAN et al. (2004), que trabalhando com células-tronco mesenquimais de camundongos, relataram que a velocidade de expansão das células derivadas do tecido adiposo foi cinco vezes mais rápida nos primeiros sete dias comparando com as células da medula óssea.

Além disto, foi possível observar que as células do tecido adiposo mantiveram populações celulares mais homogêneas enquanto as células da medula óssea apresentaram cultivo heterogêneo por mais tempo. FORTIER et al. (1998) conseguiram completar a retirada de células sanguíneas e células-tronco hematopoiéticas não aderentes da cultura de células-tronco mesenquimais no nono dia de cultivo, quando a população de células predominantes apresentou morfologia semelhante às células encontradas no presente trabalho. Assim, sugere-se que neste estudo as culturas de células provenientes do tecido adiposo tiveram as células não aderentes removidas com sucesso já na primeira troca de meio, enquanto as culturas de células provenientes da medula óssea ainda apresentaram células hematopoiéticas, embora em quantidade decrescente, presentes até a última avaliação, justificando assim o aspecto heterogêneo da cultura.

A população celular de aspecto fusiforme observada neste trabalho tanto nas amostras de tecido adiposo como de medula óssea é morfologicamente semelhante às células-tronco mesenquimais apresentadas em outros estudos com humanos e animais,

nos quais estas células são descritas como células de aspecto estrelado ou células semelhantes a fibroblasto (VIDAL et al. 2007; VIDAL et al. 2006; HEGEWALD et al., 2004; SMITH et al., 2003; ZUK et al., 2001; FORTIER et al., 1998).

3.2. Contagem de CFU

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os números absolutos de unidades formadoras de colônia (CFU) obtidos nas amostras de CTM-AD e CTM-MO, respectivamente, demonstrando que não foram observadas diferenças entre as amostras de mesma natureza cultivadas em meios diferentes.

Tabela 1. Números absolutos de unidades formadoras de colônia (CFU) obtidos em amostras de CTM-AD de equinos analisadas no 5º, 15º e 25º dias de sub-cultivo em meio DMEM ou AIM-V. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	5º dia DMEM	5º dia AIM-V	15º dia DMEM	15º dia AIM-V	25º dia DMEM	25º dia AIM-V
1	0	0	0	0	1	1
2	0	0	1	1	1	1
3	0	0	0	0	1	1
4	1	1	1	1	1	1
5	0	0	0	0	1	1
Média	0,2 ± 0,45	0,2 ± 0,45	0,4 ± 0,55	0,4 ± 0,55	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Tabela 2. Números absolutos de unidades formadoras de colônia (CFU) obtidos em amostras de CTM-MO de equinos analisadas no 5º, 15º e 25º dias de sub-cultivo em meio DMEM ou AIM-V. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	5º dia DMEM	5º dia AIM-V	15º dia DMEM	15º dia AIM-V	25º dia DMEM	25º dia AIM-V
1	1	1	1	1	2	2
2	0	0	0	0	2	2
3	0	0	0	0	2	2
4	0	0	1	1	1	1
5	1	1	1	1	2	2
Média	0,4 ± 0,55	0,4 ± 0,55	0,6 ± 0,55	0,6 ± 0,55	1,8 ± 0,45	1,8 ± 0,45

Entretanto, verificou-se diferença significativa entre as amostras de CTM-AD e de CTM-MO, de forma que as amostras oriundas da medula óssea apresentaram maior número de CFU do que as amostras de tecido adiposo (Figura 8), sugerindo capacidade superior de formação de colônias. Isso pode ser devido à maior existência de células hematopoiéticas nas amostras CTM-MO, pois estas células apresentam grande tendência para aglutinação. VIDAL et al. (2007) também observaram que populações obtidas de tecido adiposo não formam tantas colônias como as células da medula óssea e distribuem-se de maneira mais uniforme e mais aderida à placa de cultivo, como foi observado neste trabalho.

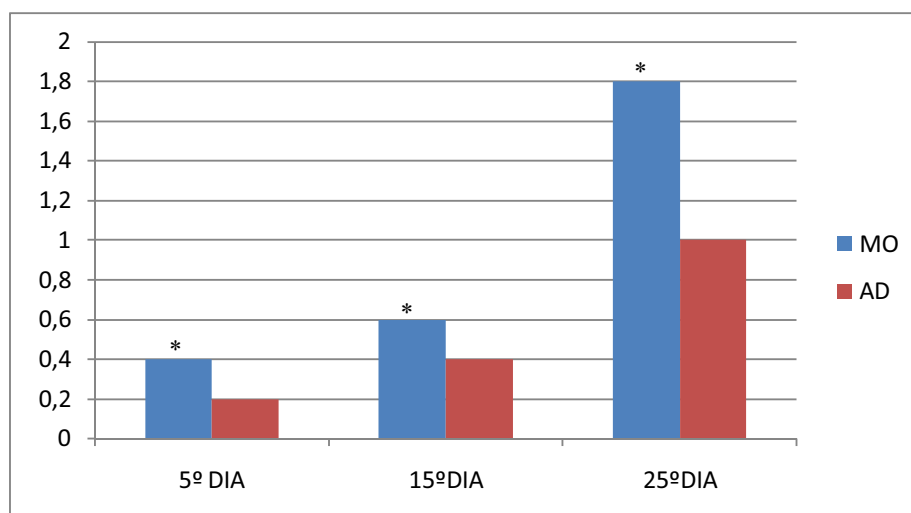


Figura 8. Ilustração gráfica dos valores de unidades formadoras de colônia (CFU) obtidos a partir de culturas de células do aspirado medular (MO) e do tecido adiposo de equinos (AD) nos 5^o, 15^o e 25^o dias de cultivo. * indica diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$ Teste t de *Student*).

3.1. Análise imunofenotípica

A primeira avaliação imunofenotípica foi realizada no terceiro dia de cultivo primário em meio RPMI-1640, antes do descarte das células sobrenadantes e do início do sub-cultivo, ou seja, ainda com as células totais. Os resultados da imunofenotipagem

estão expressos em porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados e estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 3. Imunofenotipagem de células provenientes da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (AD) de equinos, analisadas no 3º dia de cultivo primário. Resultados expressos em porcentagem de células positivas. Jaboticabal/SP, 2009.

Grupo MO	CD14	CD34	CD45	STRO-1	CD3	CD4	CD8	CD11c
1	0,9	22,4	19,2	3,9	9	0,4	0,4	0,8
2	2,2	20,3	18,2	4,2	11	0,2	0,2	0,7
3	1,1	37,9	24,1	6,1	12	0,3	0,3	0,8
4	1,5	28,2	18,9	5,2	8	0,2	0,2	0,4
5	0,8	32,4	22,2	4,8	10	0,1	0,1	2,2
Média	1,3 Aa	28,24 Ba	20,52 Ba	4,84 Aa	10,0 Ca	0,24 Aa	0,24 Aa	0,98 Aa
Grupo AD	CD14	CD34	CD45	STRO-1	CD3	CD4	CD8	CD11c
1	1,1	51,6	24,7	10,1	2,2	0	0	2,3
2	3,4	58,4	43,2	13,4	2,1	0	0	4,2
3	0,5	65,1	42,3	10,5	2,4	0	0	2,5
4	2,8	51,8	39,4	12,8	0,9	0	0	3,3
5	3,6	63,6	50,0	13,6	1,8	0	0	3,7
Média	2,28 Aa	58,1 Bb	39,92 Cb	12,08 Da	1,88 Aa	0 Aa	0 Aa	3,2 Aa

Letras maiúsculas comparam os diferentes fenótipos dentro do mesmo grupo. Letras minúsculas comparam os mesmos fenótipos entre os dois grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Entre os oito marcadores utilizados neste trabalho, os mais encontrados no primeiro momento da avaliação imunofenotípica, tanto nas amostras de CTM-MO como nas amostras de CTM-AD, foram CD34 e CD45. Os marcadores CD3 e STRO-1 apresentaram a terceira maior porcentagem nas amostras de CTM-MO e de CTM-AD, respectivamente. CD14 e CD11c foram identificados em porcentagens de ocorrência menores para ambos os grupos, e os marcadores CD4 e CD8 apareceram em porcentagem mínima nas amostras de CTM-MO e não foram identificados nas amostras de CTM-AD. A Figura 9 ilustra estes resultados.

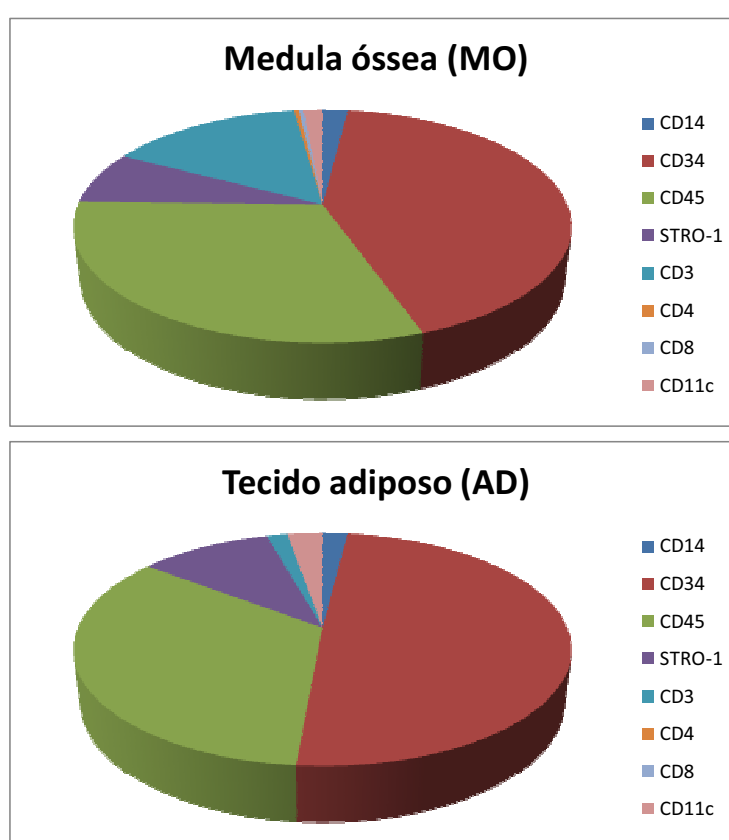


Figura 9. Ilustrações gráficas da ocorrência dos marcadores de superfície utilizados na avaliação imunofenotípica das amostras de células de medula óssea e tecido adiposo de equinos no 3º dia de cultivo primário.

A segunda avaliação imunofenotípica foi realizada no 18º dia de sub-cultivo. Como neste momento não foram verificadas diferenças entre as amostras cultivadas

em meio DMEM ou AIM-V, optou-se por submeter à análise as células cultivadas em DMEM. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Imunofenotipagem de células provenientes da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (AD) de equinos, analisadas no 18º dia de sub-cultivo. Resultados expressos em porcentagem de células positivas. Jaboticabal/SP, 2009.

Grupo MO	CD14	CD34	CD45	STRO-1	CD3	CD4	CD8	CD11c
1	3,8	5,8	1,2	18,8	0,4	0,4	ND	ND
2	2,8	4,3	3,2	10,1	0,2	0,2	ND	ND
3	2,0	7,9	4,1	14,7	0,4	0,3	ND	ND
4	1,9	8,2	2,2	10,2	0,5	0,6	ND	ND
5	3,4	2,4	2,5	20,2	0,5	0,6	ND	ND
Média	2,78	5,72	2,64	14,8	0,4	0,42	ND	ND
Grupo AD	CD14	CD34	CD45	STRO-1	CD3	CD4	CD8	CD11c
1	2,2	2,2	2,7	22,2	ND	ND	ND	ND
2	2,1	4,4	2,4	19,2	ND	ND	ND	ND
3	4,7	2,8	1,3	28,9	ND	ND	ND	ND
4	3,2	2,3	0,9	25,3	ND	ND	ND	ND
5	3,7	4,7	1,2	26,8	ND	ND	ND	ND
Média	3,18	3,28	1,7	24,48	ND	ND	ND	ND

No décimo oitavo dia de sub-cultivo, os resultados indicaram maior porcentagem de células positivas para o marcador STRO-1, tanto nas amostras de CTM-MO quanto nas amostras de CTM-AD, que apresentaram valores ainda maiores. As células marcadas com CD34 e CD45 diminuíram significativamente, enquanto houve aumento de CD14. Os marcadores CD3 e CD4 foram encontrados em quantidades semelhantes nas amostras de CTM-MO e estavam ausentes nas amostras de CTM-AD. Não foram encontradas células positivas para CD8 e CD11c em nenhuma das amostras avaliadas (Figura 10).

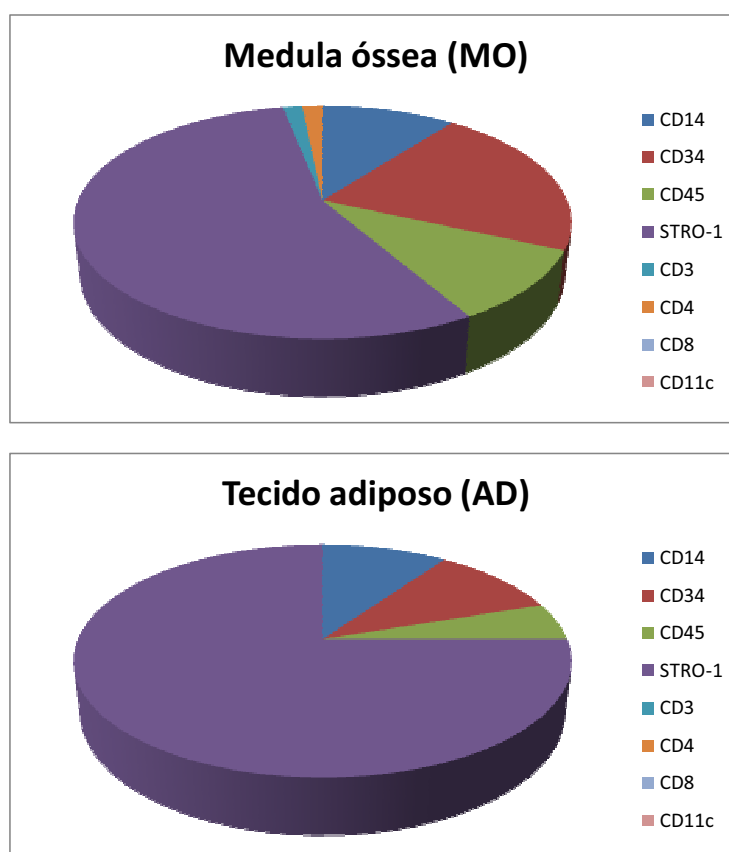


Figura 10. Ilustrações gráficas da ocorrência dos marcadores de superfície utilizados na avaliação imunofenotípica das amostras de células de medula óssea e tecido adiposo de equinos no 18º dia de sub-cultivo.

A tabela 5 apresenta os resultados da última avaliação imunofenotípica realizada com as células no 37º dia de sub-cultivo em meio DMEM.

Tabela 5. Imunofenotipagem de células provenientes da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (AD) de equinos, analisadas no 37º dia de sub-cultivo. Resultados expressos em porcentagem de células positivas. Jaboticabal/SP, 2009.

Grupo MO	CD14	CD34	CD45	STRO-1	CD3	CD4	CD8	CD11c
1	5,9	2,8	0,2	14,1	ND	ND	ND	ND
2	9,8	0,3	1,2	12,3	ND	ND	ND	ND
3	8,2	0,9	3,1	16,7	ND	ND	ND	ND
4	10,5	1,2	1,2	13,2	ND	ND	ND	ND
5	6,8	1,4	0,5	21,1	ND	ND	ND	ND
Média	8,24	1,32	1,24	15,48	ND	ND	ND	ND
Grupo AD	CD14	CD34	CD45	STRO-1	CD3	CD4	CD8	CD11c
1	5,5	0,8	0,7	25,3	ND	ND	ND	ND
2	2,2	0,4	0,4	39,4	ND	ND	ND	ND
3	6,5	1,8	0,3	32,3	ND	ND	ND	ND
4	3,3	0,9	0,5	35,1	ND	ND	ND	ND
5	6,4	0,7	0,2	29,2	ND	ND	ND	ND
Média	4,78	0,92	0,42	32,26	ND	ND	ND	ND

As células positivas para os marcadores CD3, CD4, CD8 e CD11c não estavam mais presentes em nenhuma das amostras. Observou-se diminuição expressiva das células CD34⁺ e CD45⁺, com valores significativamente menores nas amostras de CTM-AD. O segundo marcador mais encontrado foi CD14, em quantidade superior nas amostras de CTM-MO e a maioria das células analisadas neste momento da cultura eram positivas para STRO-1 em ambos os grupos, sendo que uma porcentagem superior foi encontrada nas amostras de CTM-AD.

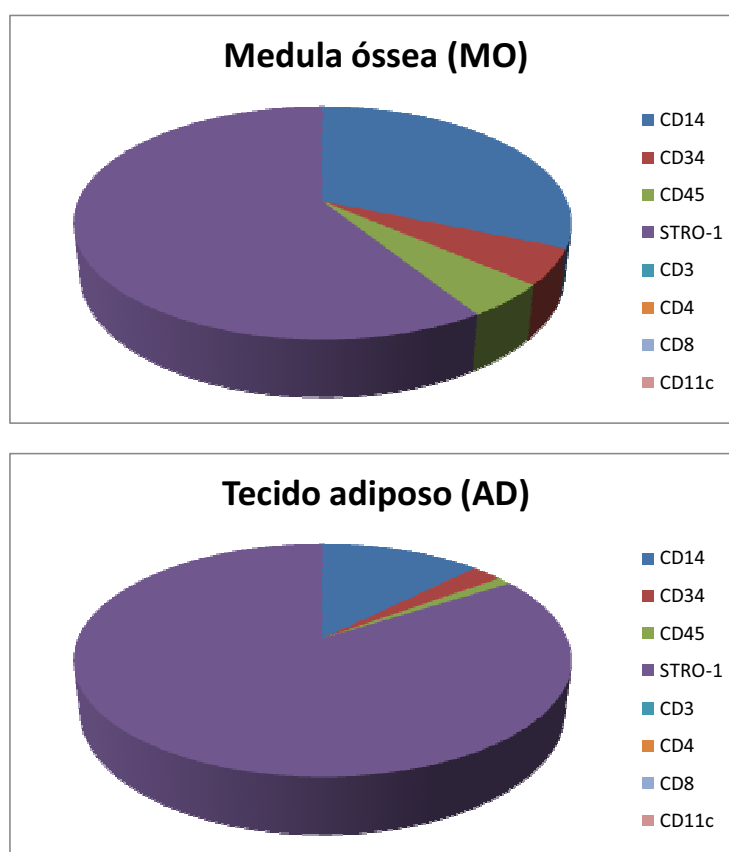


Figura 11. Ilustrações gráficas da ocorrência dos marcadores de superfície utilizados na avaliação imunofenotípica das amostras de células de medula óssea e tecido adiposo de equinos no 37º dia de sub-cultivo.

MAMBELLI et al. (2009) estudaram a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais humanas (CD29, CD31, CD34, CD45, CD117 e STRO-1) em amostras

de células-tronco mesenquimais de equinos derivadas de tecido adiposo e confrontaram seus resultados com trabalhos que haviam relatado positividade na expressão destes marcadores em células-tronco oriundas de cordão umbilical de equinos (HOYNOWSKI et al. 2007; REED et al. 2008), sugerindo que estes marcadores não são úteis na caracterização fenotípica de células-tronco mesenquimais de equinos coletadas em animais adultos. Os resultados do presente trabalho divergem daqueles obtidos por MAMBELLI et al. (2009), uma vez que houve células positivas nos três momentos avaliados para os anticorpos anti-humanos CD34, CD45, STRO-1 e CD14.

Após a observação dos resultados obtidos nas três avaliações, verifica-se que a análise imunofenotípica realizada por citometria de fluxo foi capaz de demonstrar que o perfil fenotípico das culturas de células-tronco mesenquimais de equinos sofreu modificações no decorrer do tempo de cultivo celular. ZHANG et al. (2005) também observaram que células-tronco hematopoiéticas de camundongos mudam seu fenótipo de superfície durante a expansão em cultura. Estes autores verificaram que a população de células-tronco após dez dias de cultura expressaram positividade apenas para alguns dos marcadores identificados nas células frescas e dois outros marcadores foram identificados somente nas células em cultura. CARVALHO et al. (2009), trabalhando com células-tronco mesenquimais de equinos obtidas a partir de tecido adiposo, de forma semelhante ao que foi realizado neste estudo, pesquisaram outros marcadores de superfície e observaram que a expressão de células CD44⁺ aumentou no decorrer do cultivo celular e das passagens, indicando mudanças nas características fenotípicas das células.

Neste estudo, as células presentes no início da cultura apresentaram maior expressão de marcadores hematopoiéticos, e no decorrer do tempo a expressão destes marcadores foi diminuindo, pois as células hematopoiéticas não aderentes foram sendo removidas com as trocas de meio e a porcentagem de células-tronco mesenquimais aderidas foi aumentando, assim como a expressão do marcador STRO-1. MIRANVILLE et al. (2004) trabalhando com células-tronco derivadas de tecido adiposo em humanos também encontraram grande número de células CD34⁺ em amostras recém coletadas.

Segundo WICKHAM et al. (2003), a população de células estromais indiferenciadas obtidas do tecido adiposo de humanos parece ser bastante heterogênea, uma vez que foi observada positividade de marcação para dez anticorpos diferentes.

Comparando os resultados da expressão fenotípica entre as amostras de CTM-MO e CTM-AD, verifica-se que também estão de acordo com as avaliações morfológicas, que mostraram predominância de células mesenquimais nas amostras provenientes do tecido adiposo e uma população celular mais heterogênea nas amostras provenientes de medula óssea.

A análise imunofenotípica das amostras em estudos com células-tronco é de extrema importância, pois é a maneira que se tem de caracterizar a população de células utilizadas. Assim, a comparação entre os resultados de dois trabalhos só é possível se ambos utilizaram a mesma população de células, e se a caracterização fenotípica não foi realizada não é possível ter essa garantia. Os trabalhos utilizando células-tronco na espécie equina são, em sua maioria, voltados para testes de aplicação clínica e diferenciação celular e pouco se sabe a respeito dos marcadores de membrana que caracterizam estas células. Diante disso, os resultados obtidos no presente trabalho servem como ponto de partida para outros estudos, utilizando marcadores diferentes a fim de se obter uma classificação fenotípica para células-tronco mesenquimais de equinos.

4. CONCLUSÕES

O meio de cultura AIM-V é uma alternativa para o cultivo de células-tronco mesenquimais de equinos sem a presença de soro fetal bovino.

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de equinos apresentam maior capacidade de proliferação em cultura que as células obtidas da medula óssea.

O perfil fenotípico da população de células obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo de equinos sofre modificações no decorrer do tempo de cultivo celular.

5. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 1584p.

BIEBACK, K.; HECKER, A.; KOCAÖMER, A.; LANNERT, H.; SCHALLMOSER, K.; STRUNK, D.; KLÜTER, H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**, v.27, n.9, p.2331-41, 2009.

BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, H. R.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A. P. E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.1, p.1-6, 2006.

CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, xxx (2009) xxx-xxx.

CHENG, J.; BAUMHUETER, S.; CACALANO, G.; CARVER-MOORE, K.; THIBODEAUX, H.; THOMAS, R.; BROXMEYER, H. E.; COOPER, S.; HAGUE, N.; MOORE, M.; LASKY, L. A.; Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. **Blood**, v.87, n.2, p.479-90, 1996.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, xxx (2009) xxx-xxx.

COWAN, C. M.; SHI, Y. Y.; AALAMI, O. O. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nature Biotechnology**, v.22, p.560-7, 2004.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p.501-14, 1955.

FORTIER, L. A.; NIXON, A. J.; WILLIAMS, J.; CHRISTINA, S. C. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.9, p.1182-7, 1998.

FRASER, J. K.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. Adipose-derived stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v.449, p.59-67, 2008.

GONÇALVES, R. F. Cultivo de células epiteliais da tuba uterina de bovinos na presença e ausência de soro fetal bovino: análise bioquímica, morfológica e morfométrica. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2002.

GROTTO, H. Z. W; NORONHA, J. F. A. Identificação de células-tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.3, p. 169-72, 2003.

HEGEWALD, A. A.; RINGE, J.; BARTEL, J.; KRÜGER, I.; NOTTER, M.; BARNEWITZ, D.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. **Tissue and Cell**, v.36, p.431-8, 2004.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. M.; LEMING, M. T.; TUCHER, J. R.; BLACK, L.; SAND, T. S.; MITCHELL, K. E. Characterization and differentiation of equine

umbilical cord-derived matrix cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.362, n.2, p.347-353, 2007.

KREBSBACH, P. H.; KUZNETSOV, S. A.; BIANCO, P.; GEHRON ROBEY, P. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.10, n.2, p.165-81, 1999.

MAMBELLI, L. I.; SANTOS, E. J. C; FRAZÃO, M. S.; CHAPARRO, M. S.; KERKIS, A.; ZOPPA, A. L. V.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering: Part C**, v.15, n.1, p.87-94, 2009.

MIRANVILLE, A.; HEESCHEN, C.; SENGES, C. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. **Circulation**, v.110, p.349-55, 2004.

MURAGLIA, A.; CORSI, A.; RIMINUCCI, M.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; BIANCO, P.; QUARTO, R. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone marrow stromal-cells. **Journal of Cell Science**. v.116, p.2949-55, 2003.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.966-73, 2005.

NAKAYAMA, T.; MUTSUGA, N.; TOSATO, G. Effect of fibroblast growth factor 2 on stromal cell-derived factor 1 production by bone marrow stromal cells and hematopoiesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v.99, n.3, p.223-35, 2007.

PAL, R.; HANWATE, M.; JAN, M.; TOTEY, S. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.3, n.3, p.163-74, 2009.

REED, S. A.; JOHNSON, S. E. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. **Journal of Cellular Physiology**, v.215, n.2, p.329-336, 2008.

SMITH, R. K. W.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.1, p.99-102, 2003.

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C. M.; WHEI-SHOU, H. U. Culture system for pluripotent stem cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.1, p.12-27, 2005.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; JOHNSON, J. R.; LOPEZ, M. J.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. **Veterinary Surgery**, v.35, p.601-10, 2006.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, p.613-22, 2007.

VIEIRA, S. **Biostatística – tópicos avançados**. 2ªed. São Paulo: Campus, 2004, 232p.

WICKHAM, M. Q.; ERICKSON, G. R.; GIMBLE, J. M.; VAIL, T. P.; GUILAK, F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.412, p.196-212, 2003.

ZHANG, C. C.; LODISH, H. Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion. **Blood**, v.105, n.11, p.4314-20, 2005.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-28, 2001.

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DO TGF- β 1 EM CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE EQUINOS OBTIDAS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO ADIPOSEO.

RESUMO – Os fatores que induzem diferenciação das células-tronco mesenquimais de equinos ainda não são bem conhecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do TGF- β 1 sobre culturas de células-tronco mesenquimais equinas. Cinco cavalos adultos foram submetidos à coleta de medula óssea do esterno e, em seguida, de tecido adiposo da região glútea próxima a inserção da cauda. As amostras foram processadas para o isolamento de células mononucleares, utilizando-se gradiente de densidade Ficoll. Após 72 horas de cultivo primário e remoção das células não aderentes, as amostras foram cultivadas em dois tipos de meios de cultivo diferentes: meio DMEM acrescido de 10% de SFB ou AIM-V sem SFB. Os meios de cultivo foram trocados a cada três dias e no vigésimo quinto dia, foi adicionado 10ng/ml de TGF- β 1 aos meios DMEM e AIM-V, mantendo um grupo controle sem TGF- β 1 para cada meio. Depois de seis dias avaliou-se os efeitos do TGF- β 1 sobre as culturas. A presença do TGF- β 1 aumentou significativamente o número de unidades formadoras de colônia, havendo diferenças entre as amostras e os meios de cultivo. As porcentagens de necrose e apoptose também foram determinadas antes e após o tratamento, encontrando-se diferenças significativas. A avaliação citoquímica por meio da coloração com Alcian Blue identificou a presença de proteoglicanas sulfatadas apenas nas amostras tratadas com TGF- β 1, sugerindo que a presença do fator exerceu efeito estimulante para a diferenciação condrogênica.

Palavras-Chave: apoptose, células-tronco mesenquimais, equinos, necrose, TGF- β 1.

1. INTRODUÇÃO

O reparo de lesões em tecido cartilaginoso permanece ainda como um desafio clínico expressivo. A lesão da cartilagem articular apresenta limitado potencial de reparo e grandes defeitos não cicatrizam espontaneamente. Quando a lesão se estende ao osso subcondral, o processo de reparo é esporádico, sendo a cartilagem articular original substituída por fibrocartilagem e tecido cicatricial, os quais são estruturalmente inferiores à arquitetura hialina da cartilagem articular normal (HUANG et al., 2004).

Os tratamentos convencionais para os defeitos cartilaginosos incluem técnicas de estimulação da medula, como a perfuração subcondral, e artroplastias. Infelizmente essas opções, bem como as estratégias desenvolvidas recentemente usando enxertos osteocondral, pericondral e periosteal não resultam em completa regeneração da arquitetura hialina original e a articulação é incapaz de suportar o peso e atividade física por períodos prolongados (HUANG et al., 2004).

Entre as estratégias terapêuticas desenvolvidas pela engenharia de tecidos, a implantação de condrócitos representa uma alternativa promissora diante das técnicas tradicionais. Contudo, o uso de condrócitos alógenos carrega o risco inerente da reação auto-imune. O uso de condrócitos autógenos elimina este risco, mas é limitado pela falta de locais adequados do doador e a necessidade de grandes amostras de cartilagem doada. Em virtude destas dificuldades, outras fontes precursoras de condrócitos têm sido estudadas e a utilização de células-tronco mesenquimais parece ter aplicabilidade óbvia, visto que são células progenitoras pluripotentes capazes de se diferenciar em muitos tipos celulares, incluindo condrócitos (WORSTER et al., 2000).

Os fatores que induzem o desenvolvimento das células-tronco mesenquimais de equinos em condrócitos ainda não são bem conhecidos. Em estudos com células-tronco mesenquimais realizados em indivíduos da espécie humana, a diferenciação condrogênica foi estimulada por meio do tratamento das células com fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (ZUK et al., 2001; HUANG et al., 2004; HUANG et al., 2005). A utilização do TGF- $\beta 1$ na diferenciação condrogênica também foi testada com sucesso em equinos por WORSTER et al. (2000) e HEGEWALD et al. (2004). Ambos os grupos trabalharam apenas com células-tronco mesenquimais obtidas de

aspirados da medula óssea. Em alguns destes estudos (HUANG et al., 2004; HEGEWALD et al., 2004; ZUK et al., 2001;), a diferenciação condrogênica foi comprovada por meio de análise citoquímica, na qual identificou-se a presença de proteoglicanas sulfatadas, tipicamente encontrada na matriz cartilaginosa, e que podem ser visualizadas com o uso da coloração Alcian Blue em pH ácido (LEV & SPICER, 1964).

O TGF- β 1 é uma citocina envolvida em muitos eventos biológicos como imunossupressão, angiogênese, crescimento celular e apoptose (ABRAHAM et al., 2009). Em geral, os membros da superfamília TGF-beta influenciam numerosos processos fisiológicos, incluindo a apoptose, em uma variedade de órgãos e tecidos (SCHULZ et al., 2008).

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas. A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana citoplasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e reação inflamatória local (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Em 1964, foi proposto o termo “morte celular programada” para designar um tipo de morte celular que não ocorre de forma acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes tóxicos (GRIVICICH et al., 2007).

De modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido onde ocorre retração da célula e perda de aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas.

As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana citoplasmática forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam em número e tamanho e se rompem, originando estruturas contendo os resíduos celulares. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito condrogênico do TGF- β 1 sobre células-tronco mesenquimais de equinos obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo e mantidas em dois diferentes meios de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento e cultura das células-tronco mesenquimais

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas da medula óssea do esterno e do tecido adiposo da região glútea de cinco cavalos adultos, e processadas para o isolamento de células mononucleares, utilizando-se gradiente de densidade (Ficoll¹, 1,077g/dl).

As células provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-AD) de cada cavalo foram incubadas em frascos de cultivo celular de 25cm² na concentração inicial de 5×10^5 células/ml em volume final de 3ml de RPMI² em duplicata e mantidas em incubadora a 5% de CO₂ e 37°C.

¹ Ficoll-Paque. Science Pro, São Caetano do Sul/SP.

² RPMI 1640. Cultilab, Campinas/SP.

Após 72 horas de incubação, ou seja, de cultivo primário, as células não-aderentes foram removidas, lavando-se as garrafas com solução de *Hanks*³ livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Para o desprendimento das células aderidas foi utilizada solução de tripsina⁴ a 0,25% acrescida de EDTA⁵ (0,01%) por 5 minutos ou até a visualização do total desprendimento das células do fundo das garrafas. Para inibir a ação da tripsina as células foram ressuspensas em meio de cultivo RPMI contendo soro fetal bovino⁶ (SFB) a 10% e o sub-cultivo celular ocorreu em placa de 24 poços, contendo cada poço 1×10^4 células/ml em um volume total de 1,0ml de meio DMEM⁷ acrescido de 10% de SFB ou meio AIM-V⁸ sem SFB. As replicações celulares ou passagens foram realizadas sempre que as células atingiram confluência de 90% e, na quarta passagem, as células foram transferidas dos poços para garrafas de 25cm². Os meios de cultivo foram trocados a cada três dias e no vigésimo quinto dia, foi adicionado 10ng/ml de TGF- β 1⁹ aos meios DMEM e AIM-V, mantendo um grupo controle para cada meio.

2.2. Contagem de CFU

As culturas de células-tronco foram observadas em microscópio de luz invertida, e o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi obtido observando-se cinco campos aleatórios por garrafa de cultura de cada animal e contando-se o número de células agrupadas, sendo mais do que cinco células agrupadas considerado uma colônia. A contagem foi realizada antes da introdução do TGF- β 1, e seis dias após.

As fotomicrografias das CFU foram obtidas utilizando-se um Fotomicroscópio (Olympus) acoplado a um microscópio invertido (AxioVert, Zeiss) equipado com câmera fotográfica de 35mm e filme Kodacolor Gold 100 (Kodak®).

³ Solução Balanceada Hanks. Cultilab, Campinas/SP.

⁴ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

⁵ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

⁶ Cultilab, Campinas/SP.

⁷ Cultilab, Campinas/SP.

⁸ GIBCO Invitrogen, São Paulo/SP.

⁹ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

2.3. Avaliação de apoptose e necrose celular

Para detectar o número de células em apoptose ou necrose, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo proposta por LORA et al. (2004), e as avaliações foram realizadas no vigésimo quinto dia de cultivo, antes da adição do TGF- β 1, e seis dias após.

Como marcadores foram utilizados a anexina V¹⁰ marcada com isotiocianato de fluoresceína – FITC (uma substância de fluorescência verde) e o iodeto de propídeo¹¹. A anexina V se liga especificamente à fosfatidilserina, uma proteína disposta na porção interna da membrana citoplasmática, que é exteriorizada durante o processo de apoptose. O iodeto de propídeo (PI) é um marcador fluorescente (fluorescência vermelha) que intercala-se apenas ao DNA de células em necrose.

Após a contagem total de células em câmara de Neubauer, o número de células foi ajustado para uma concentração final de 1×10^5 células contidas em 100 μ l de uma solução tampão (10mM Hepes/NaOH; 140mM NaCl; 2,5mM CaCl₂; pH=7,4). As células foram incubadas em tubos de propileno, protegidas da luz e a temperatura ambiente durante 15 minutos com Anexina-V conjugada previamente com FITC (1 μ g/ml- Laboratório de Imunologia do ICB-USP; São Paulo/SP - marcador de apoptose) e iodeto de propídeo (15 μ g/ml - marcador de necrose). A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo.

Técnica de citometria de fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Os resultados de fluorescência foram adquiridos em escala logarítmica. A fluorescência verde da Anexina-V+FITC foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de

¹⁰ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

¹¹ Sigma Chemicals, St. Louis, EUA.

propídeo (PI) foi mensurada a $585\pm 42\text{nm}$ (FL2). A quantificação da expressão dos marcadores de membrana foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelos reagentes fluorescentes. Quando utilizada dupla marcação, as fluorescências do PI e do FITC foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos.

2.4. Análise citoquímica

A análise citoquímica foi realizada no trigésimo primeiro dia de cultivo, seis dias após o tratamento com TGF- β 1, a fim de verificar se a presença do fator no meio de cultivo estimulou ou não a diferenciação condrogênica.

Utilizou-se o método de inclusão de bloco celular em parafina ("cell block"). As células utilizadas na confecção das lâminas em "cell block" foram obtidas a partir da tripsinização das garrafas de cultivo celular e o número foi ajustado para 2×10^6 células/ml. Foram adicionados 100 μl de células em preparação de agarose a 1% não solidificado em um microtubo. Aguardou-se a solidificação do ágar e o mesmo foi retirado do microtubo com o auxílio de uma agulha tomando-se o cuidado para não destruir o bloco de ágar contendo as células. O cilindro de ágar foi incluído em parafina e cortes de 5 μm foram realizados conforme técnicas histológicas convencionais. A coloração de Alcian Blue em pH 2,5 foi realizada conforme técnica padrão (TOLOSA et al., 2003).

2.5. Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do teste *Tukey-Kramer* de comparações múltiplas (VIEIRA, 2004). Para a realização dos testes foi utilizado o programa GraphPad Prism 3.0. O limite de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Contagem de CFU

O termo unidades formadoras de colônia (CFU) é utilizado para designar aglomerados de células. A Figura 1 ilustra duas CFU (setas) observadas microscopicamente em cultura de células obtidas do tecido adiposo (CTM-AD) em meio DMEM com TGF- β 1, no trigésimo primeiro dia de cultivo.

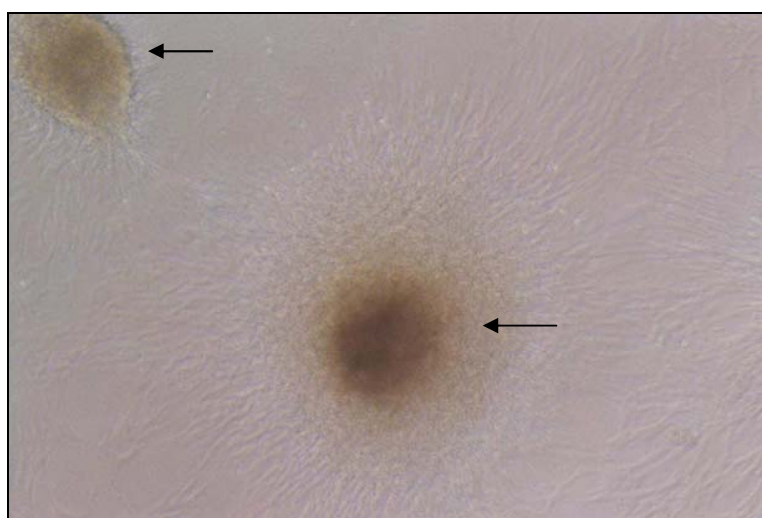


Figura 1. Fotomicrografia de CFU - unidades formadoras de colônia (setas) observadas em cultura de células-tronco mesenquimais de equinos obtidas de tecido adiposo e mantidas em cultura em meio DMEM com TGF- β 1. Aumento de 20x.

Os valores obtidos na contagem de CFU em amostras obtidas de tecido adiposo (CTM-AD) cultivadas em meio DMEM ou AIM-V, na presença ou não de TGF- β 1, estão apresentados na Tabela 1. Verifica-se que não houve diferença significativa no número de CFU entre os dois meios utilizados, tanto no vigésimo quinto quanto no trigésimo primeiro dias de cultivo. Entretanto, quando se observa os resultados das amostras cultivadas na presença de TGF- β 1, nota-se aumento significativo do número de CFU nas culturas mantidas nos dois meios, porém, o número encontrado nas amostras cultivadas em meio DMEM com TGF- β 1 foi superior.

Tabela 1. Números absolutos de unidades formadoras de colônia (CFU) em amostras obtidas de tecido adiposo (CTM-AD) de equinos analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio DMEM ou AIM-V, na presença ou ausência de TGF- β 1. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	25º dia DMEM	25º dia AIM-V	31º dia DMEM	31º dia AIM-V	31º dia DMEM + TGF- β 1	31º dia AIM-V+ TGF- β 1
1	1	1	1	1	7	3
2	1	1	1	1	6	3
3	1	1	0	2	5	2
4	1	1	1	1	5	2
5	1	1	1	1	5	3
Média	1,0 $\pm$ 0,0 A	1,0 $\pm$ 0,0 A	0,8 $\pm$ 0,45 A	1,2 $\pm$ 0,45 A	5,6 $\pm$ 0,89 B	2,6 $\pm$ 0,55 C

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).
Teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas.

De forma semelhante, as amostras de células obtidas da medula óssea (CTM-MO) não apresentaram diferenças significativas nos valores de CFU entre os meios DMEM e AIM-V no vigésimo quinto e no trigésimo primeiro dias de cultivo e a presença de TGF- β 1 também promoveu aumento no número de CFU. Entretanto, ao contrário do que se observou nas amostras de tecido adiposo, esse aumento foi significativo somente nas amostras cultivadas em meio AIM-V com TGF- β 1 (Tabela 2).

Tabela 2. Números absolutos de unidades formadoras de colônia (CFU) em amostras obtidas de medula óssea (CTM-MO) de equinos analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio DMEM ou AIM-V, na presença ou ausência de TGF- β 1. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	25º dia DMEM	25º dia AIM-V	31º dia DMEM	31º dia AIM-V	31º dia DMEM + TGF- β 1	31º dia AIM-V+ TGF- β 1
1	2	2	2	1	2	3
2	2	2	2	2	3	5
3	2	2	2	1	3	5
4	1	1	1	2	2	4
5	2	2	2	1	2	4
Média	1,8 $\pm$ 0,45 A	1,8 $\pm$ 0,45 A	1,8 $\pm$ 0,45 A	1,4 $\pm$ 0,55 A	2,4 $\pm$ 0,55 A	4,2 $\pm$ 0,84 B

Segundo BIANCO et al. (2001) a eficiência de uma cultura de células em formar colônias é altamente dependente das condições de cultivo celular e existe grande variabilidade entre as necessidades de uma espécie animal para outra. Os fatores mitogênicos necessários para estimular a formação de CFU não são completamente conhecidos até o momento, mas sabe-se que incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento transformante β (TGF- β). Os resultados obtidos neste trabalho confirmam este efeito estimulante do TGF- β 1 sobre culturas de células-tronco mesenquimais de equinos e estão de acordo com os resultados obtidos por WORSTER et al. (2000) e HUANG et al. (2004), que observaram aumento de agregação celular e formação de nódulos em culturas de células-tronco tratadas com TGF- β 1.

3.2. Avaliação de apoptose e necrose celulares

As figuras a seguir são resultantes das análises por citometria de fluxo. A Figura 2 é chamada de *dot plot*, e representa a distribuição ou dispersão das células em um gráfico típico de citometria de fluxo, onde cada ponto preto representa uma célula. Quanto mais à direita no eixo X, maior é a célula, e quanto mais para cima no eixo Y, mais granularidade ela possui.

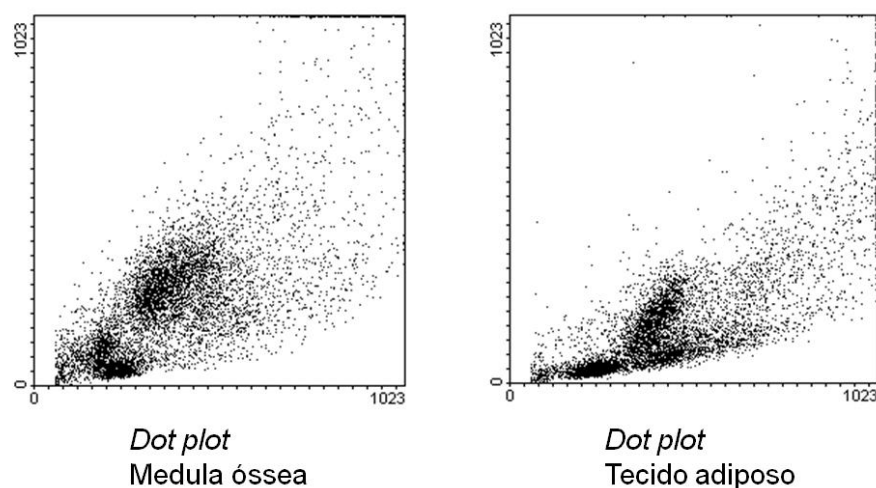


Figura 2. Ilustração de *dot plots* obtidos em análise por citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais equinas obtidas da medula óssea e tecido adiposo.

A Figura 3 apresenta alguns histogramas. Eles indicam a intensidade de fluorescência de uma amostra de células, que é diretamente proporcional à viabilidade celular. É uma convenção da técnica de citometria que o que estiver acima de $\log_{10}^1$ é positivo para o marcador fluorescente utilizado, ou seja, quanto mais para a direita do eixo X, mais fluorescente está uma determinada população celular.

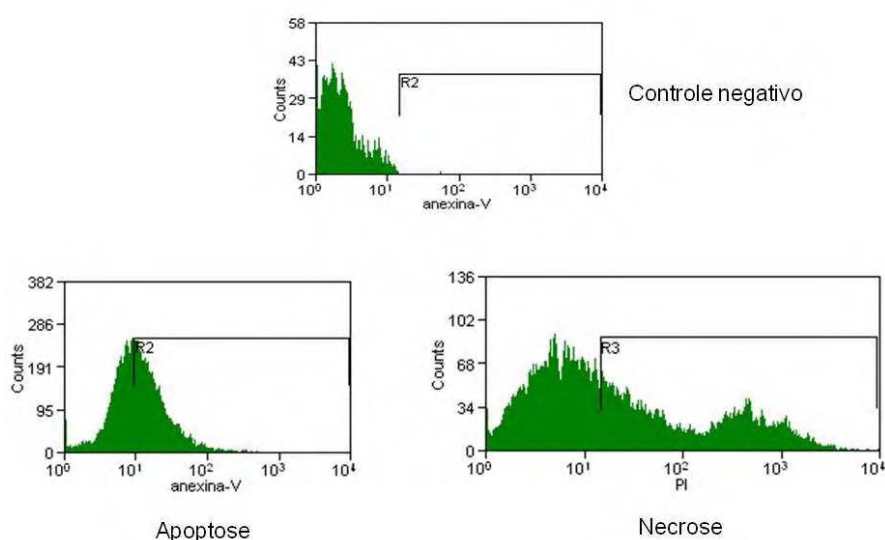


Figura 3. Ilustração de histogramas resultantes de análise por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos nas análises por citometria de fluxo para avaliação de necrose e apoptose celulares das amostras de tecido adiposo (CTM-AD) cultivadas em meio DMEM estão apresentados na Tabela 3, onde se verifica que no vigésimo quinto e no trigésimo primeiro dias de cultivo, não houve diferença entre os valores de necrose e apoptose, embora tenha ocorrido aumento significativo entre a primeira e a segunda análise. No entanto, nas amostras cultivadas na presença de TGF- β 1, esta relação de equilíbrio entre necrose e apoptose não foi mantida, observando-se uma porcentagem superior de células em apoptose.

Tabela 3. Porcentagens de células em necrose e apoptose nas amostras obtidas de tecido adiposo (CTM-AD) analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio DMEM na presença ou ausência de TGF-β1. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	25º dia DMEM % necrose	25º dia DMEM % apoptose	31º dia DMEM % necrose	31º dia DMEM % apoptose	31º dia DMEM + TGF-β1 % necrose	31º dia DMEM + TGF-β1 % apoptose
1	4	5	10	11	12	22
2	10	4	12	10	16	22
3	3	3	13	11	15	18
4	8	7	10	12	17	21
5	5	5	12	15	13	20
Média	6 ± 2,91 A	4,8 ± 1,48 A	11,4 ± 1,34 B	11,8 ± 1,92 B	14,6 ± 2,07 B	20,6 ± 1,67 C

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas.

Resultados bastante diferentes foram encontrados nas amostras de CTM-AD cultivadas em meio AIM-V (Tabela 4). Neste meio de cultivo, as porcentagens de necrose celular foram superiores aos valores de apoptose em todas as avaliações, tanto na presença como na ausência de TGF-β1.

Tabela 4. Porcentagens de células em necrose e apoptose nas amostras obtidas de tecido adiposo (CTM-AD) analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio AIM-V na presença ou ausência de TGF-β1. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	25º dia AIM-V % necrose	25º dia AIM-V % apoptose	31º dia AIM-V % necrose	31º dia AIM-V % apoptose	31º dia AIM-V + TGF-β1 % necrose	31º dia AIM-V + TGF-β1 % apoptose
1	18	5	20	6	33	18
2	20	6	27	8	27	15
3	19	12	21	12	31	15
4	20	9	25	9	25	12
5	13	5	22	7	30	14
Média	18 ± 2,91 A	7,4 ± 3,04 B	23 ± 2,91 A	8,4 ± 2,30 B	29,2 ± 3,19 C	14,8 ± 2,16 D

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas.

Em relação às amostras de CTM-MO, os resultados obtidos foram contrários aos observados com as CTM-AD. Em meio DMEM (Tabela 5), as porcentagens de necrose foram estatisticamente superiores às de apoptose no trigésimo primeiro dia de cultivo, independente da presença ou não TGF- β 1.

Tabela 5. Porcentagens de células em necrose e apoptose nas amostras obtidas de medula óssea (CTM-MO) analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio DMEM na presença ou ausência de TGF- β 1. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	25º dia DMEM % necrose	25º dia DMEM % apoptose	31º dia DMEM % necrose	31º dia DMEM % apoptose	31º dia DMEM + TGF- β 1 % necrose	31º dia DMEM + TGF- β 1 % apoptose
1	12	5	27	8	40	18
2	14	7	24	9	34	15
3	15	10	25	10	30	17
4	11	10	22	11	32	12
5	10	8	21	10	37	19
Média	12,4 $\pm$ 2,07 A	8,0 $\pm$ 2,12 A	23,8 $\pm$ 2,38 B	9,6 $\pm$ 1,14 A	34,6 $\pm$ 3,97 C	16,2 $\pm$ 2,77 D

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas.

Já em meio AIM-V, as amostras de CTM-MO, apresentaram relação equilibrada entre necrose e apoptose no vigésimo quinto e trigésimo primeiro dia de cultivo, mas mostrou aumento significativo na presença de TGF- β 1, com a porcentagem de células em apoptose superior a das células em necrose (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagens de células em necrose e apoptose nas amostras obtidas de medula óssea (CTM-MO) analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio AIM-V na presença ou ausência de TGF- β 1. Jaboticabal/SP, 2009.

Animal	25º dia AIM-V % necrose	25º dia AIM-V % apoptose	31º dia AIM-V % necrose	31º dia AIM-V % apoptose	31º dia AIM-V + TGF- β 1 % necrose	31º dia AIM-V + TGF- β 1 % apoptose
1	9	10	11	11	13	22
2	5	14	10	18	15	20
3	6	11	13	10	15	19
4	7	11	10	10	14	18
5	10	11	11	10	16	25
Média	7,4 $\pm$ 2,07 A	11,4 $\pm$ 1,52 A	11,0 $\pm$ 1,22 A	11,8 $\pm$ 3,49 A	14,6 $\pm$ 1,14 B	20,8 $\pm$ 2,77 C

Dividindo os valores médios das porcentagens de necrose pelos valores médios de apoptose, foi encontrado um valor que representa a relação necrose/apoptose, facilitando a visualização simultânea de cada tempo e meio com as amostras de CTM-AD e CTM-MO, conforme apresenta a Tabela 7. Os valores próximos de 1,0 mostram o equilíbrio da relação e valores maiores ou menores indicam maior ocorrência de necrose ou apoptose, respectivamente.

Tabela 7. Relação necrose/apoptose em culturas de CTMs-AD e CTMs-MO analisadas no 25º e 31º dias de sub-cultivo em meio DMEM ou AIM-V na presença ou ausência de TGF- β 1. Jaboticabal/SP, 2009.

Amostra	25º dia DMEM	25º dia AIM-V	31º dia DMEM	31º dia AIM-V	31º dia DMEM + TGF- β 1	31º dia AIM-V + TGF- β 1
AD	1, 2	2,4	1,0	2,7	0,7	2,0
MO	1,5	0,7	2,5	0,9	2,1	0,7

O aumento da ocorrência de apoptose após a suplementação com TGF- β 1 nas culturas de células onde havia equilíbrio entre necrose e apoptose sugere que o fator exerça efeito indutor de apoptose. Esta atividade indutora de apoptose do TGF- β 1 sobre diversos tipos celulares também foi relatada por outros pesquisadores (YOO et al., 2009; FERRARI et al., 2009; SCHULZ et al., 2008). Segundo SCHULZ et al. (2009) as funções apoptóticas dos TGF-betas sobre o sistema nervoso adulto ou em desenvolvimento já são bem conhecidas. De acordo com YOO et al. (2009) o TGF- β 1 é um regulador de apoptose de células epiteliais prostáticas e, em roedores, a castração induz a produção de TGF- β 1 pelas células estromais, induzindo a apoptose das células epiteliais.

FERRARI et al. (2009) também relataram o efeito apoptótico do TGF- β 1 sobre células endoteliais e o papel importante que este efeito representa no controle da angiogênese. *In vitro*, o efeito apoptótico do TGF- β 1 sobre as células é rápido e seguido por um longo período em que as células são refratárias à apoptose. Os estudos *in vivo*

demonstraram que o efeito apoptótico do TGF- β 1 é tão rápido como o observado *in vitro* e que o fator exerce tanto apoptose como angiogênese, efetuando papel regulador neste processo.

Os resultados obtidos neste trabalho também mostraram haver influência do meio de cultivo sobre o tipo de morte celular prevalente nas culturas de células-tronco mesenquimais de equinos e, além disso, que existe diferença entre as amostras obtidas a partir de medula óssea ou de tecido adiposo. Apesar de não terem sido encontrados trabalhos semelhantes para que fosse possível confrontar estes achados, a idéia levantada neste estudo sugere a necessidade de melhor entendimento sobre as condições de cultivo destas células quando se pensa em aplicação clínica, pois considerando que durante o processo de necrose ocorrem danos às células vizinhas e reação inflamatória local enquanto na apoptose os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados e removidos sem causar processo inflamatório (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004), seria mais indicado se transplantar uma população de células onde a morte celular estivesse ocorrendo por apoptose.

3.3. Análise citoquímica

A diferenciação condrogênica é caracterizada pela formação de nódulos celulares entremeados a uma matriz extracelular constituída de colágeno tipo II e proteoglicanas sulfatadas. Estas proteoglicanas sulfatadas podem ser especificamente detectadas pela coloração Alcian Blue.

Conforme se observa nas figuras abaixo, a coloração azulada ao redor das células foi verificada tanto em amostras de CTM-MO (Figura 4) quanto em amostras de CTM-AD (Figura 5a) após seis dias de cultivo com TGF- β 1, confirmando a presença de proteoglicanas sulfatadas e a atuação deste fator na indução condrogênica, uma vez que as amostras controle não foram coradas (Figura 5b).

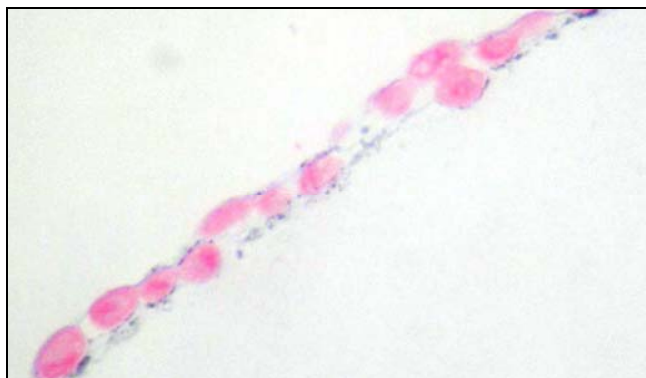


Figura 4. Fotomicrografia de CTM-MO cultivadas na presença de TGF- β 1 e coradas com Alcian Blue. Aumento de 20x. Notar coloração azul ao redor das células.

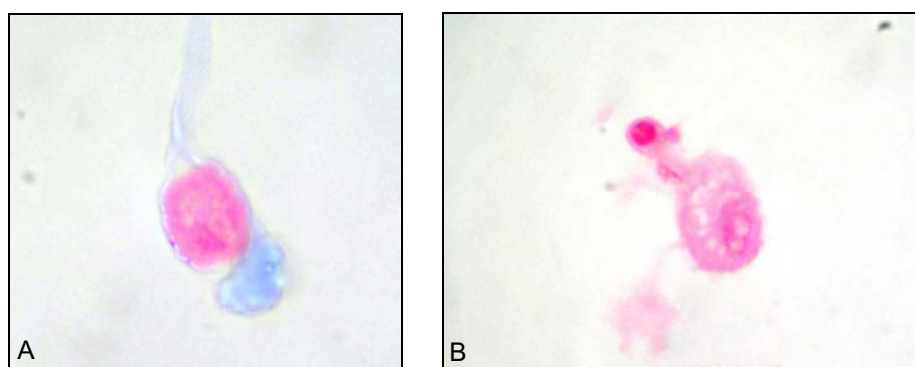


Figura 5. Fotomicrografias de CTM-AD cultivadas na presença (A) ou ausência (B) de TGF- β 1. Coloração Alcian Blue. Aumento de 40x. Notar coloração azul ao redor da célula somente em A.

O potencial condrogênico do TGF- β 1 sobre culturas de células-tronco mesenquimais de equinos também foi observado por WORSTER et al. (2000) e HEGEWALD et al. (2004) em estudos utilizando células obtidas da medula óssea, mas ainda não havia sido utilizado em cultura de células obtidas de tecido adiposo de equinos. Segundo CANCEDDA et al. (1995), a capacidade de estimulação condrogênica do TGF- β 1 não é uma surpresa, visto que na cartilagem embrionária este fator é expressado abundantemente e pode estar envolvido na transformação condrogênica de condensações mesenquimais primitivas.

A concentração de TGF- β 1 utilizada no presente trabalho está de acordo com outros estudos (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; HUANG et al., 2004; HUANG et al., 2005). No entanto, ainda existem discussões a respeito da quantidade ideal a ser

utilizada. Segundo HUANG et al. (2004), o aumento da concentração de TGF- β 1 de 1ng/ml para 10ng/ml resultou em acelerada formação de nódulos celulares e aumento na expressão de proteoglicanas. Entretanto, quando a concentração foi aumentada para 100ng/ml notou-se diminuição da diferenciação condrogênica. Já WORSTER et al. (2000) testaram as concentrações de 0, 1, 5 e 10ng/ml e observaram resposta mais pronunciada nas culturas tratadas com TGF- β 1 na concentração de 5ng/ml. Segundo estes autores, as culturas de células expostas ao TGF- β 1 na concentração de 10ng/ml apresentaram algumas áreas de perda de aderência celular. Assim, parece existir um consenso de que o efeito estimulante do TGF- β 1 sobre a diferenciação condrogênica de culturas de células-tronco mesenquimais é dose-dependente, porém, a concentração ideal pode estar relacionada com outros fatores relacionados à cultura.

4. CONCLUSÕES

A suplementação do meio de cultivo com TGF- β 1 aumenta significativamente o número de colônias formadas em culturas de células-tronco mesenquimais de equinos.

O TGF- β 1 exerce efeito indutor de apoptose em culturas de células-tronco mesenquimais de equinos.

O meio de cultivo influencia a porcentagem de ocorrência de necrose ou apoptose em culturas de células-tronco mesenquimais de equinos.

A suplementação do meio de cultivo com TGF- β 1 estimula a diferenciação condrogênica em culturas de células-tronco mesenquimais de equinos.

5. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S.; SWEET, T.; KHALILI, K.; SAWAYA, B. E.; AMINI, S. Evidence for activation of the TGF-beta1 promoter by C/EBPbeta and its modulation by Smads. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v.29, n.1, p.1-7, 2009.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. **Stem Cells**, v.19, n.3, p.180-92, 2001.

CANCEDDA, R.; DESCALZI, F.; CASTAGNOLA, P. Chondrocyte differentiation. **International Review of Cytology**, n.159, p.265-358, 1995.

FERRARI, G.; COOK, B. D.; TERUSHKIN, V.; PINTUCCI, G.; MIGNATTI, P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor mediated apoptosis. **Journal of Cellular Physiology**, v.219, n.2, p.449-58.

GRIVICICH, I; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-43, 2007.

HEGEWALD, A. A.; RINGE, J.; BARTEL, J.; KRÜGER, I.; NOTTER, M.; BARNEWITZ, D.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. **Tissue and Cell**, v.36, p.431-38, 2004.

HUANG, J. I.; KAZMI, N.; DURBHAKULA, M. M.; HERING, T. M.; YOO, J. U.; JOHNSTONE, B. Chondrogenic potencial of multipotencial cells from human adipose tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.113, n.2, p.585-94, 2004.

HUANG, J.I .; KAZMI, N.; DURBHAKULA, M. M.; HERING, T. M.; YOO, J. U.; JOHNSTONE, B. Chondrogenic potencial of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v.23, p.1383-89, 2005.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.6, p.239-57, 1972.

LEV, R; SPICER, S. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v.12, p.309, 1964.

LORA, J., ALONSO, F. J., SEGURA, J. A., LOBO, C., MARQUEZ, J., MATES, J. M. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.4298-306, 2004.

SCHULTZ, R.; VOGEL, T.; DRESSEL, R.; KRIEGLTEIN, K. TGF-beta superfamily members, Activin A and TGF-beta1, induce apoptosis in oligodendrocytes by the different pathways. **Cell Tissue Research**, v. 334, n. 3, p. 327-38, 2008.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G.; **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ªed. São Paulo: Manole, 2003. 341p.

YOO, K. S.; NASTIUK, K. L.; KROLEWSKI, J. J. Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis by suppressing FLICE-like inhibitory protein in DU145 prostate epithelial cells. **International Journal of Cancer**, v.124, n.4, p.834-42, 2009.

VIEIRA, S. **Biostatística – tópicos avançados**. 2ªed. São Paulo: Campus, 2004, 232p.

WORSTER. A. A.; NIXON, A. J.; BROWER-TOLAND, B. D.; WILLIAMS, J. Effect of transforming growth factor β 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.9, p.1003-10, 2000.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, v. 19, p.124-28, 2004.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUAG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implication for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-28, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.4279-95, 2002.