LEANDRO FADEL

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DE SANGUE UMBILICAL E DE TECIDO ADIPOSO COLETADOS POR VIA
INTRAABDOMINAL E UTERINA EM OVINOS

São Paulo

2009

LEANDRO FADEL

Caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletada por via intraabdominal e uterina em ovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2147

FMVZ

Fadel, Leandro

Caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais desangue umbilical e de tecido adiposo coletada por via intraabdominal e uterina em ovinos / Leandro Fadel. - São Paulo: L. Fadel, 2009. 57 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Mesenquimal. 2. Sangue de cordão umbilical. 3. Tecido adiposo. 4. Ovino. 5. Cirurgia abdominal. 6. Intra-uterina. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Transplante heterólogo de células mesenquinais de cordão umbilical em ovinos com osteonecrose da cabeça do fêmur induzida", protocolado sob o nº1203/2007, utilizando 12 (doze) ovinos, sob a responsabilidade do Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "Heterologous transplant of umbilical blood cord mesenchymal cells in induced osteonecrosis of femoral head in sheeps", protocol number 1203/2007, utilizing 12 (twelve) ovine, under the responsibility Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FADEL, Leandro					
Título: Caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletada por via intraabdominal e uterina em ovinos					
	Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências				
Data://2009					
Banca Examinadora					
Prof.Dr	Instituição:				
Assinatura	Julgamento:				
	Instituição:				
Assinatura	Julgamento:				

Prof.Dr._____Instituição: _____

Assinatura_____Julgamento:____

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Paulo e Vera, pelo incentivo e confiança em mim depositados. Ao meu irmão Gustavo, meus avôs Ivone, Lourdes e Antônio e todos meus familiares pelo convívio e por fazer parte do que eu sou hoje.

À professora Maria Angélica Miglino pela oportunidade e confiança na realização desse projeto.

Ao professor Carlos Eduardo Ambrósio pelo aceite e orientação durante essa fase tão importante.

Ao professor Eduardo Harry Birgel Junior pela colaboração na realização da experimental.

À todo o pessoal do Canil GRMD, por todos os momentos de vivência, que me ensinaram muito. Os momentos bons ficarão na memória pra sempre e os difíceis serviram de ensinamento. Obrigado a todos!

Ao Matheus, pela amizade e ajuda durante toda a realização desse projeto, muito obrigado amigo.

Aos amigos da "Estamo-nos aqui", Sarmento, Thiago e Evander; muito obrigado pela convivência, companheirismo e amizade. Visheee !!!

À Angélica, amiga desde a graduação, obrigado por, mais uma vez, estar presente em um momento importante da minha vida.

À Marina Brito (Galega) e à Marina Moreira, muito obrigado pela amizade valiosa de vocês e diversas horas de boa conversa e boa companhia.

À Cristiane por estar sempre disposta a me ensinar a utilizar o laboratório e transmitir seus conhecimentos adquiridos nessa área.

À todos, que não tiveram seus nomes aqui citados, mas que participaram durante essa fase, muito obrigado por terem participado dessa fase importante da minha vida.

Resumo

RESUMO

FADEL, L. Caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletada por via intraabdominal e uterina em ovinos. [Morphological characterization of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and adipose tissue collected trough intraabdominal and uterine in sheep]. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células estromais não-hematopoiéticas que possuem capacidade de diferenciação, sendo capazes, de diferenciar em diversos tecidos. As MSCs residem em vários tecidos vêm sido isoladas de diferentes tecidos, tais como cartilagem, tendão, tecido adiposo, do vaso e sangue umbilical, além de tecidos fetais. O isolamento e caracterização das populações mesenquimais no modelo ovino se faz importante, visto que ele é usado em ensaios pré-clínicos ortopédicos. Nesse estudo foram utilizados 5 amostras de sangue de cordão umbilical e 5 amostras de tecido adiposo peri-renal, provenientes de 10 ovinos fêmeas adultas. As coletas foram realizadas através de cirurgia para que o material coletado fosse o mais asséptico possível. Essas amostras foram submetidas a diferentes protocolos de isolamento, com a finalidade de se testar o mais eficiente. Somente um protocolo de cada tecido mostrou-se eficiente no isolamento da MSCs, porém nenhuma dessas amostras manteve-se viável após a primeira passagem.

Palavras-chave: Mesenquimal. Sangue de cordão umbilical. Tecido adiposo. Ovino. Cirurgia abdominal. Intra-uterina.

Abstract

ABSTRACT

FADEL, L. Morphologic characterization of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and adipose tissue collected trough intraabdominal and uterine in sheep. [Caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletada por via intraabdominal e uterina em ovinos]. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are non hematopoietic stromal cells that are able to differentiate through several tissues. MCSs home in several tissues and are being isolated from different tissues, such cartilage, tendon, adipose tissue, vessels and umbilical blood, and also from fetal tissues. The isolation and characterization of mesenchymal cells in sheep are important, because it is used in orthopedic preclinical trials. In this study were used 5 samples of umbilical blood and 5 samples of perirenal adipose tissue from 10 female sheep. All the samples were obtained through surgery, to harvest aseptic samples. These samples were tested in different protocols to evaluate the more efficient. Just one protocol from each source showed significant results in isolation, although none of the samples survived trough the first passage.

Keywords: Mesenchymal. Umbilical cord blood. Adipose tissue. Ovine. Abdominal surgery. Intrauterine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fêmeas da raça Santa Inês adquiridas no município de São Paulo para a realização do experimento	24
Figura 2 -	Procedimento cirúrgico, cordocentese intra-uterina em ovino. (A) região do flanco esquerdo tricotomizada e após anti-sepsia. (B) incisão cirúrgica da pele. (C e D) exposição do corno uterino gravídico. (E) após realização da histerotomia. (F) exposição do membro pélvico do feto para facilitar o acesso do cordão umbilical. (G e H) exposição e centese da artéria do cordão umbilical.	26
Figura 3 -	Procedimento cirúrgico, coleta de tecido adiposo peri-renal em ovino. (A) região do flanco esquerdo tricotomizada e após anti-sepsia. (B) incisão cirúrgica da musculatura. (C) Fragmento de tecido adiposo a ser coletado. (D) Pós-operatório imediato	27
Figura 4 -	Processamento para isolar células mononucleares do cordão umbilical com <i>Ficoll Hipaqui</i> ^{fm} <i>Plus.</i> A fluxo laminar MINIFLOW I. Em B , C e D alíquota sanguínea sendo diluída e homogeneizada em meio de cultivo DMEM-H. E amostras do sangue de cordão umbilical sendo centrifugadas em centrífuga Rotina 46R (<i>Hettich Zentrifugen</i> tm). F sangue do cordão umbilical antes da centrifugação e G , após a centrifugação	30
Figura 5 -	A imagem acima destaca a diferença de duas amostras obtidas entre dois protocolos distintos, em A amostra contendo Ficoll Hipaqui tm Plus, após centrifugação e formação de "pellet" de células totais do sangue (asterisco) e destaque para o "halo" esbranquiçado (seta). Em B evidenciamos a amostra sem ficoll, com formação de um "pellet" de células totais do sangue (asterisco)	31
Figura 6 -	Em A garrafa de cultivo (25cm²). B identificação das garrafas com dia, mês, o meio de cultivo, a quantidade de células e o material inoculado. C e D garrafas com o meio de cultivo e o material sendo inoculado. E garrafas sendo armazenadas na estufa de CO₂. F estufa Thermo Electron Corparation	33
Figura 7 -	Fotografias evidenciando cordeiro no dia do nascimento após 11 dias do procedimento para a coleta do sangue do cordão umbilical. Em A evidenciamos a fração do cordão aderido à mãe. B e C mostram o cordeiro amamento e na figuraD evidenciamos a viabilidade do cordeiro pós-parto	38
Figura 8 -	Fotomicrografia das células do cordão umbilical de ovinos em cultivo Protocolo 1. Fotomicrografias realizadas em períodos alternados. Observar a presença de células pequenas circulares não aderentes (seta). Em A, B e C células expandidas em meio de cultivo ALFA-MEM suplementado com SFB-GIBCO com 48 horas de cultivo; 192 horas em B, 240 horas em C e com 264 horas em D em meio DMEM-L suplementado com SFB-GIBCO. Barra= 50µm	40

Figura 9 -	Fotomicrografias das células de sangue cordão umbilical de ovinos provenientes do Protocolo 2. A , C e E período de 288 horas de cultivo enquanto que em B , D e F período de 408 horas. A e B células cultivadas em meio Alfa-MEM suplementado com SFB-GIBCO e C e D meio DMEM-H suplementado com SFB-GIBCO e em E e F meio DMEM-L suplementado com SFB-GIBCO. As imagens acima permitem a visualização de células inviáveis quanto ao crescimento e aderência ao meio de cultivo (setas). Barra = 25μm	-1
Figura 10 -	Fotomicrografias das células de sangue de cordão umbilical de ovinos provenientes da repetição do Protocolo 2. A, B, C e D com meio DMEM-H suplementado com SFB-GIBCO e com tempo de cultivo de, respectivamente, 168, 336, 696 e 888 horas. Em B a seta indica célula aderida. Em C e D as setas indicam as células mesenquimais isoladas do sangue de cordão. Barra = 50 µm	-2
Figura 11 -	Fotomicrografias das células de sangue de cordão umbilical de ovinos provenientes do Protocolo 3. A, B, C e D com meio Alpha-MEM suplementado com SFB-GIBCO e com tempo de cultivo de, respectivamente, 168, 336, 696 e 840 horas. Em B, C e D as setas indicam células aderidas que potencialmente podem ser células mesenquimais. Barra = 50 µm	.3
Figura 12 -	Fotomicrografias das células de sangue de cordão umbilical de ovinos provenientes da repetição do Protocolo 3. A e B com meio Alpha-MEM suplementado com SFB-GIBCO e com tempo de cultivo de 504 horas. Barra = 50 µm. A = 40x e B = 200x	4
Figura 13 -	Fotomicrografias referente ao protocolo 1 de isolamento de células de tecido adiposo. A 24 horas após o isolamento. B 240 horas após o isolamento sem nenhuma célula viável. Barra = 50 μm. A e B = 100x4	.5
Figura 14 -	Fotomicrografias referente ao protocolo 2 de isolamento de células de tecido adiposo. A 24 horas após o isolamento. B 240 horas após o isolamento, notar a presença de células inviáveis e com aspecto morfológico não desejável . Barra = 50 μm. A e B = 100x	-6
Figura 15 -	Fotomicrografias referente ao protocolo 3 de isolamento de células de tecido adiposo. A 24 horas após o isolamento. B 240 horas após o isolamento sem nenhuma célula viável. Barra = 50 μm. A e B = 100x4	-6
Figura 16 -	Fotomicrografias referente ao protocolo 4 (segunda amostra) de isolamento de células de tecido adiposo. A 24 horas após o isolamento. B 360 horas após o isolamento com células com característica morfológica fibroblastóide. Barra = 50 μm. A e B = 100x	-6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.15
2	OBJETIVOS	.17
2.1	Geral	.17
2.2	Específico	.17
3	REVISÃO DE LITERATURA	.19
3.1	Células tronco de cordão umbilical	.19
3.2	Células tronco de tecido adiposo	.20
4	MATERIAL E MÉTODOS	.23
4.1	Animais Experimentais	.23
4.2	Protocolo Anestésico	.24
4.3	Coleta do sangue do cordão umbilical	.25
4.4	Coleta do tecido adiposo	.27
4.5	Isolamento e cultivo de células do sangue umbilical	.28
4.5.1	Protocolo 1	.28
4.5.2	Protocolo 2	.29
4.5.3	Protocolo 3	.29
4.5.4	Expansão in vitro das células do sangue umbilical	.31
4.6	Isolamento e cultivo de células do tecido adiposo	.34
4.6.1	Protocolo 1	.34
4.6.2	Protocolo 2	.34
4.6.3	Protocolo 3	.35
4.6.4	Protocolo 4	.35
5	RESULTADOS	.37
5.1	Coleta do sangue do cordão umbilical	.37

5.2	Cultivo celular das células de sangue umbilical	38
5.3	Coleta do tecido adiposo	44
5.4	Cultivo celular das células de tecido adiposo	44
6	DISCUSSÃO	48
6.1	Coleta e isolamento de células de sangue de cordão umbilical	48
6.2	Coleta e isolamento de células de tecido adiposo	50
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	55

Introdução

Introdução 15

1 INTRODUÇÃO

As células tronco, também conhecidas como "stem cells" ou células mãe, foram descritas pela primeira vez por Friedenstein, Gorskajak e Kalajina (1974), os quais caracterizaram estas como *stem cells* fibroblásticas capazes de formar colônias (fibroblastos formadores de colônias: CFU-f). Possuem morfologia fibroblastóide, com alta capacidade para replicação e após estímulo apropriado podem se diferenciar em todos os tipos celulares (CARDOSO; GONZALES; EZQUERRA, 2003).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células estromais nãohematopoiéticas que possuem capacidade de diferenciação, sendo capazes, de diferenciar em diversos tecidos, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo (POUNTOS; GIANNOUDIS, 2005).

As MSCs residem em vários tecidos, mas originalmente foram isoladas de aspirado de medula óssea, porém as MSCs vêm sido isoladas de diferentes tecidos, tais como cartilagem, tendão, tecido adiposo, do vaso e sangue umbilical, além de tecidos fetais (ROMANOV; SVINTSITKAYA; SMIRNOV, 2003).

O isolamento e caracterização das populações mesenquimais no modelo ovino se faz importante, visto que ele é usado em ensaios pré-clínicos ortopédicos (MANGGOLD et al., 2002), de estudo de reações à xenotransplante (JAGER et al., 2006) e também em cirurgia uterina (DUNCOMBE et al., 2002).

Com vista na extração de células-tronco no modelo ovino, e fazendo uso da cirurgia abdominal, seguindo o acesso cirúrgico uterino e o acesso a região renal; focamos a coleta de tecidos para a posterior caracterização de células-tronco em ovinos e efetuar testes para validar meios de cultivos eficientes para proliferação celular de tecido ovino.

Objetivos 17

2 **OBJETIVOS**

2.1 Geral

Caracterizar a mais adequada fonte de células-tronco, para futuro uso em terapias regenerativas, dado a importância do modelo animal ovino na pesquisa préclínica em ortopedia, e também, a geração de banco de células-tronco animal.

2.2 Específico

- Caracterizar cada fonte de células-tronco, do tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical.
- Análise da melhor fonte de acordo com o tipo de procedimento cirúrgico e facilidade de isolamento das células-tronco do referido tecido.
- 3. Expansão *in vitro* da populações mesenquimais confluentes e com alta capacidade de replicação.

Revisão de literatura

Revisão de Literatura 19

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura será disposta em tópicos individualizados para facilitar a compreensão do trabalho dispondo de uma vista geral sobre os assuntos.

3.1 Células tronco de cordão umbilical

Estudos mostram que o sangue do cordão umbilical é uma fonte rica em células-tronco e células progenitoras com alta capacidade proliferativa (DIMITRIOU, 2004; COHEN; NAGLER, 2004). Assim as células-tronco de cordão umbilical se tornaram uma alternativa factível para transplante, tanto autólogo, como heterólogo (COHEN; NAGLER, 2004).

Dentre as vantagens do transplante a partir do cordão umbilical estão: a ausência de risco para o doador, facilidade e segurança durante a coleta, reduzido risco de rejeição e rápida disponibilidade (WALDLOW; PORTER, 2002; BARKER; WAGNER, 2003; SECCO et al., 2008b).

Barker e Wagner (2003) relatam a possibilidade das células-tronco de cordão umbilical gerar células de tecidos não-hematopoiéticos, representando uma nova fonte de células multipotentes, além da medula óssea.

No entanto, a presença de células de MSCs no sangue umbilical é controversa. Alguns pesquisadores, utilizando sangue umbilical humano, obtiveram sucesso no isolamento (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; LEE et al., 2004), enquanto outros falharam ou obtiveram uma pequena quantidade (MARESKI et al., 2001; WEXLER et al., 2003).

Chang et al. (2006) isolaram de sangue de cordão umbilical humano células mesenquimais, que apresentaram duas características fenotípicas diferentes porém com capacidades osteo-, adipo- e condrogênicas semelhantes, resultado também obtido por Secco et al. (2008a). Além dessas linhagens, as células-tronco de cordão umbilical já foram, também, diferenciadas em hepatócitos (KANG et al., 2006) e neurônios (PARK; LEE; KANG, 2006).

Revisão de Literatura 20

Fuchs et al. (2005) e Jager et al. (2006), em seus estudos, provaram a existência de células mesenquimais e sua capacidade de diferenciação em células de linhagem óssea, adiposa e cartilagínea; a partir do sangue de cordão umbilical de ovinos.

3.2 Células tronco de tecido adiposo

Os primeiros trabalhos com o isolamento de células da gordura foram realizados por Rodbell (1966) e Rodbell e Jones (1966). Os autores coletaram amostras de gordura de ratos, lavaram o material para retirar células de origem hematopoiética e incubaram fragmentos do tecido com colagenase, centrifugando o material resultante separando a porção flutuante de adipócitos maduros do pellet da fração vascular estromal .A fração vascular estromal é composta de uma população de células heterogênea, incluindo células circulantes do sangue, fibroblastos, pericitos, e células endoteliais bem como "pré-adipócitos" ou progenitores de adipócitos (RODBELL; JONES, 1966).

Posteriormente esse procedimento de isolamento foi modificado para utilização em espécimes de gordura de seres humanos (VAN; BAYLISS; RONCARI, 1976).

Inicialmente a coleta de gordura era realizada ocasionalmente em meio a outros procedimentos cirúrgicos. Com o aumento do número de cirurgias plásticas e o advento da cirurgia lipoaspirativa, o acesso a esse tipo de material foi facilitado, garantindo assim, uma fonte inesgotável para a obtenção de células progenitoras de adipócitos.

Zuk et al. (2001) identificaram uma população de células na gordura humana de lipoaspiração com características semelhantes as de células-tronco caracterizadas através da citometria de fluxo e diferenciação em tecidos ósseos, cartilaginosos, musculares e adipogênicos.

Zuk et al. (2002) caracterizaram extensivamente através de testes moleculares e bioquímicos as células extraídas da gordura humana, podendo afirmar que o tecido adiposo é uma fonte para obtenção de células-tronco

Revisão de Literatura 21

multipotentes, com características de marcação celular e de expressão de genes com características únicas, que diferem das células-tronco mesenquimais em alguns aspectos.

O tecido adiposo possui origem mesodermal e mesenquimal, e contém um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado. Baseado nisso, podemos afirmar que o tecido adiposo pode ser uma fonte inestimável de células-tronco, com ampla possibilidade de utilização no campo da medicina regenerativa.

Tecido adiposo pode ser coletado em grande quantidade com mínima morbidade. Além disso, o isolamento e expansão de células-tronco da gordura (CTG) vêm sendo realizado com sucesso apresentando grande potencial de diferenciação tecidual. A soma dessas características e a fácil obtenção desse material sugerem que a gordura pode ser uma fonte inestimável para a sua aplicação em biotecnologia (FRASER et al., 2006).



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados dez ovelhas fêmeas da raça Santa Inês, com idade entre 18 a 24 meses, hígidas. Os animais foram mantidos na Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes da FMVZ-USP em duas baias de 12 metros quadrados, cinco animais em cada baia. Foi fornecida alimentação à base de feno duas vezes ao dia e 200 gramas de ração peletizada por animal uma vez ao dia. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições de manejo durante todo período experimental.

Os animais foram adquiridos do município de São Paulo (SP) (Figura 1). Os ovinos foram devidamente transportados para o Hospital Veterinário, setor de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) com colaboração do professor Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, onde se realizou a coleta do sangue do cordão umbilical, através de cordocentese intra-uterina, descrita posteriormente.

Foram coletadas 5 amostras de sangue de cordão umbilical, de fetos com aproximadamente 140 dias de gestação; sendo que o volume total de sangue aspirado por animal foi de 20 ml. O sangue foi obtido, através de punção da artéria umbilical, o qual foi posteriormente transportado em caixa de isopor com gelo, para o Laboratório de Células-Tronco do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).

Para realizar o isolamento a partir do tecido adiposo, foram obtidas 5 amostras. O tecido adiposo foi coletado de forma asséptica da região peri-renal esquerda, sendo colocados em tubos Falcon estéreis e após acondicionado em caixa de isopor e transportado imediatamente para o Laboratório de Células-Tronco do setor supra-citado.



Figura 2 - Fêmeas da raça Santa Inês adquiridas no município de São Paulo para a realização do experimento

4.2 Protocolo Anestésico

Os animais foram submetidos à jejum de sólidos de 24 horas e de líquidos, de 12 horas. Após o jejum, os animais foram pré-medicados com 0,3 mg/kg de midazolam associado a 2 mg/kg de cloridrato meperidina por via intravenosa na mesma seringa.

Após 5 minutos da realização da medicação pré-anestésica, os animais foram induzidos à anestesia com 3 mg/kg de propofol associado à 5 μg/kg de fentanil por via intravenosa, intubados com sonda endotraqueal de tamanho 9G e mantido em com anestésico inalatório isofluorano.

Todos os procedimentos anestésicos foram realizados com monitoração cardíaca e oximetria de pulso. Os animais submetidos às coletas receberam 0,2 mg/Kg de meloxicam e 25 mg/Kg de dipirona sódica para analgesia imediata, mantida posteriormente com 0,1m/Kg de meloxicam uma vez ao dia durante aproximadamente 5 dias. Foi feita, também, antibioticoterapia profilática em todos os animais a base de penicilina na dose de 20.000 UI/Kg durante 5 dias.

4.3 Coleta do sangue do cordão umbilical

A coleta do material foi realizada sob condições higiênicas e assépticas evitando assim à contaminação das amostras pelo meio externo.

Utilizou-se duas técnicas para a coleta do sangue umbilical, a cordocentese intra-uterina e a cesariana.

Para realização da cordocentese intra-uterina utilizou-se a técnica descrita por Hecker (1974).

O procedimento cirúrgico inicia-se, com a tricotomia do flanco esquerdo e antisepsia da região com iodo povidona e posteriormente álcool iodado a 2,5% (Figura 2-A); seguida da incisão com auxílio de uma lâmina de bisturi. Primeiramente incisou-se, a pele, os músculos abdominais (interno e externo) e o peritônio, obtendo desta forma acesso à cavidade abdominal, onde, após afastar cranialmente o rúmen, foi possível identificar e exteriorizar o útero gravídico.

Após a identificação e exteriorização do corno uterino gestante, foram aplicadas duas suturas seromuscular de apoio com fio absorvível. As suturas foram tracionadas e realizou-se uma incisão longitudinal no órgão entre elas, na curvatura maior do corno gravídico, desviando de região com maior vascularização (Figura 2-B), procedimento este que possibilitou o acesso, que após divulsão das membranas fetais fez-se a exposição do cordão umbilical (Figura 2-C, D e E). Com o feto e seus invólucros ainda dentro do útero, sem incisar a placenta, realizou-se a punção da artéria umbilical com auxilio de uma seringa de 5 ml (previamente heparinizada) e agulha 25x7 (Figura 2-F, G e H). O cordão foi devolvido ao interior do útero, realizando a sutura do órgão, o qual, este foi devidamente recolocado na cavidade abdominal, de tal forma a retornar ao seu local anatômico de origem, prosseguiu com a sutura do peritônio, músculos abdominais (externo e interno) e pele.

O material coletado foi acondicionado em tubos heparinizados de 9ml, para os processamentos de cultivo celular. Todas as amostras seguiram para o Laboratório de Células-Tronco do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), em caixas de isopor a 4°C onde foram fracionadas e processadas.

Nos animais nos quais foi utilizada a cesariana, procedeu-se do mesmo modo a técnica de cordocentese intra-uterina até a coleta do sangue. Após a coleta, a

placenta era rompida e cordão umbilical era clampeado com uso de pinças de Crille e incisado ente elas. Foi feita a ligadura do cordão e a sutura do útero, músculos abdominais e pele do mesmo modo descrito acima.

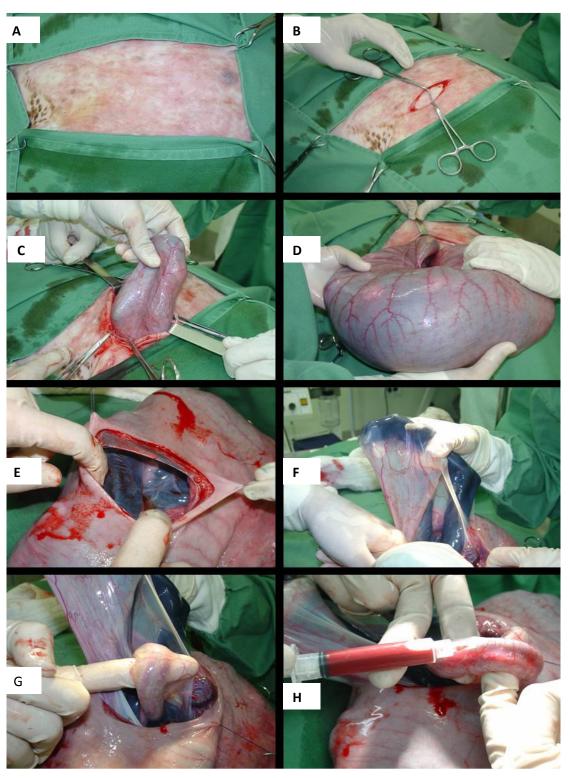


Figura 2 - Procedimento cirúrgico, cordocentese intra-uterina em ovino. (A) região do flanco esquerdo tricotomizada e após anti-sepsia. (B) incisão cirúrgica da pele. (C e D) exposição do corno uterino gravídico. (E) após realização da histerotomia. (F) exposição do membro pélvico do feto para facilitar o acesso do cordão umbilical. (G e H) exposição e centese da artéria do cordão umbilical

4.4 Coleta do tecido adiposo

O acesso à cavidade abdominal foi realizado como descrito anteriormente, onde neste procedimento, foi realizado incisão paracostal. Após rebater o rúmen cranialmente, o rim esquerdo foi identificado (Figura 3-A, B).

O tecido adiposo peri-renal foi divulsionado manualmente e depois pinçado com pinça Crille (Figura 3-C). Incisou-se o material no qual foi acondicionado em tubo falcon estéril e após em isopor com gelo. Realizou-se a ligadura do tecido adiposo remanescente, a fim de evitar qualquer tipo de hemorragia.

Prossegui-se com a sutura do peritônio, músculos abdominais (externo e interno) e pele para o término do procedimento (Figura 3-D).

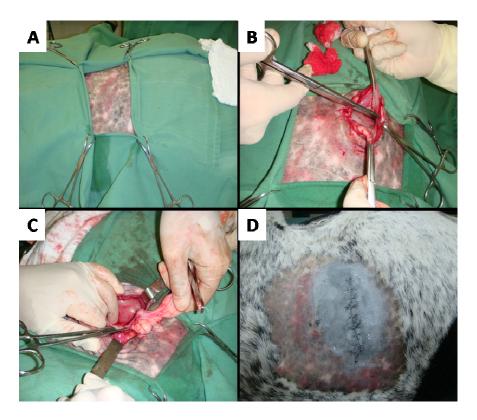


Figura 3 - Procedimento cirúrgico, coleta de tecido adiposo peri-renal em ovino. (A) região do flanco esquerdo tricotomizada e após anti-sepsia. (B) incisão cirúrgica da musculatura. (C) Fragmento de tecido adiposo a ser coletado. (D) Pós-operatório imediato

4.5 Isolamento e cultivo de células do sangue umbilical

Com o objetivo de isolar as células tronco mesenquimais do sangue de cordão umbilical de ovinos "in vitro" foi necessária a realização de diversos ensaios a fim de isolarmos as células mononucleares do sangue umbilical.

Todo o procedimento de separação de células mononucleares ocorreu dentro do fluxo laminar MINIFLOW I de forma que os materiais utilizados, a superfície de contato e o ambiente estivessem esterilizados, reduzindo assim as chances de qualquer tipo de contaminação das amostras e dos meios de cultivo (Figura 4-A).

4.5.1 Protocolo 1

A fração do sangue destinada ao cultivo celular foi primeiramente diluída em solução contendo DMEM-H na proporção 1:1 (Figura 4-B, C, D e F), a esta solução foi então adicionado Ficoll Hipaquitm Plus lentamente. O material então foi centrifugado na centrifuga Rotina 46R (Hettich Zentrifugen) durante 25 minutos a 1600 rpm a 20 °C (Figura 4-E), com o objetivo de formar um "pellet" de células mononucleares (Figura 4-G). Após a centrifugação, não foi observada a formação do "pellet" característico de células mononucleares, e sim de um discreto "halo" esbranquiçado (Figura 5-A); o qual foi isolado e submetido a 3 lavagens com solução fisiológica a 2000 rpm por 7 minutos a 20 °C, a fim de retirar todo Ficoll Hipaquitm Plus excedente, o qual apresenta toxicidade para as células.

O "pellet" resultante das centrifugações foi contado em câmara de neubauer e transferido para garrafas de cultivo de 25cm², estas foram incubadas em estufa Thermo Electron Corporation (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator HEPA Class 100) sob as condições de cultivo a 37°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.5.2 Protocolo 2

O procedimento ocorreu dentro do fluxo laminar MINIFLOW I. A fração do sangue foi diluída em solução contendo DMEM-H na proporção 3:1, esta solução foi filtrada em malha mesh de 100 μm e posteriormente centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos a 20°C.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi desprezado, e o "pellet" foi resuspendido em 10 ml de PBS, a esta solução foi então adicionado Ficoll Hipaquitm Plus lentamente. O material foi centrifugado durante 30 minutos a 2.500 rpm a 20 °C. Após a centrifugação ocorreu a formação de um discreto "halo" esbranquiçado, este foi transferido de tubo com ajuda de uma pipeta e lavado 2 vezes com PBS por 5 minutos na centrifuga a 2.500 rpm e 20 °C. O material resultante foi então foi contado em câmara de neubauer sendo posteriormente transferido para garrafas de cultivo de 25 cm²; cada garrafa recebeu um total de 2,0 x 10⁶ de células mononucleares, sendo as mesmas encubadas em estufa Thermo Electron Corparation (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator HEPA Class 100) sob as condições de cultivo a 37° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.5.3 Protocolo 3

O procedimento ocorreu dentro do fluxo laminar MINIFLOW I. O sangue foi diluído em solução contendo DMEM-H na proporção 3:1, foi centrifugado por 30 minutos a 2.026 rpm a 20°C. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" foi ressuspendido com 10 ml de DMEM-H, sendo novamente centrifugado por 3 vezes a 2.156 rpm por 7 minutos a 20°C.

O material resultante do procedimento (Figura 5-B) foi contado em câmara de neubauer e transferido para garrafas de cultivo de 25 cm²; cada garrafa recebeu um total de 2,5x10⁴ de células mononucleares, foram incubadas na estufa Thermo Electron Corparation (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator HEPA Class 100) sob as condições de cultivo a 37°C com umidade relativa próxima de 100% e

atmosfera gasosa de 5% de CO_{2.} Após 72 horas as células não aderentes foram desprezadas.

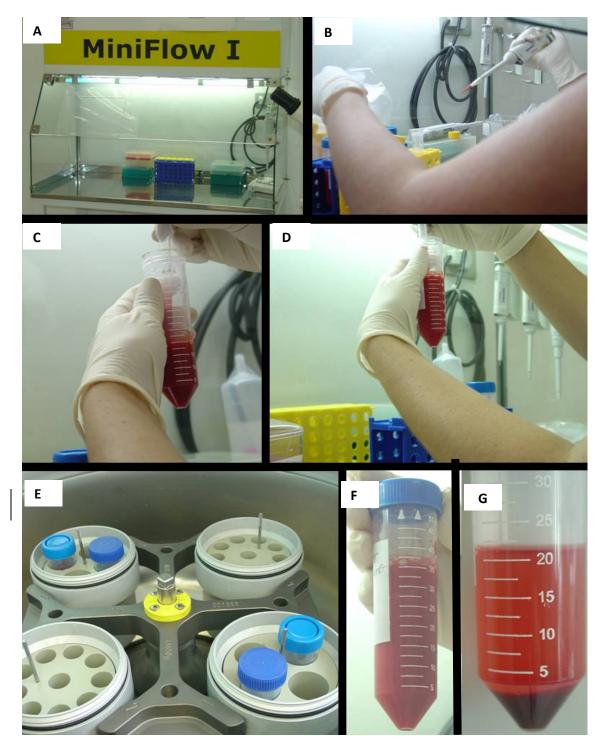


Figura 4 - Processamento para isolar células mononucleares do cordão umbilical com *Ficoll Hipaqui*^{fm} *Plus.* **A** fluxo laminar MINIFLOW I. Em **B**, **C** e **D** alíquota sanguínea sendo diluída e homogeneizada em meio de cultivo DMEM-H. **E** amostras do sangue de cordão umbilical sendo centrifugadas em centrífuga Rotina 46R (*Hettich Zentrifugen*tm). **F** sangue do cordão umbilical antes da centrifugação e **G**, após a centrifugação

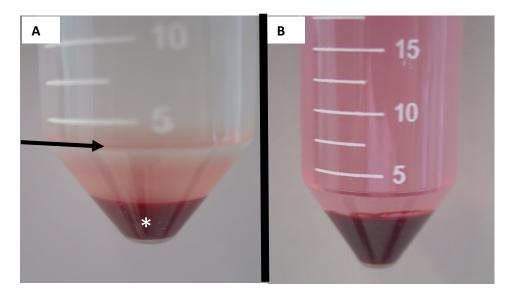


Figura 5 - A imagem acima destaca a diferença de duas amostras obtidas entre dois protocolos distintos, em A amostra contendo Ficoll Hipaquitm Plus, após centrifugação e formação de "pellet" de células totais do sangue (asterisco) e destaque para o "halo" esbranquiçado (seta). Em B evidenciamos a amostra sem ficoll, com formação de um "pellet" de células totais do sangue (asterisco)

4.5.4 Expansão in vitro das células do sangue umbilical

Com o objetivo de expandir células tronco mesenquimais em cultura foi utilizado 3 preparações de meios de cultivo destinadas a expansão do tipo celular citado. Desta forma avaliaremos o crescimento celular comparando as características celulares resultantes do cultivo, podendo estabelecer o meio de cultivo ideal para as células de cordão umbilical de ovinos.

Os meios de cultivo utilizados foram Alfa-MEM (Alpha Minimum Essential Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino-GIBCO e 1% penicilina/estreptomicina; DMEM-High (Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose), suplementado com 10% de soro fetal bovino-GIBCO e 1% penicilina/estreptomicina; DMEM-Low (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Low Glucose), suplementado com 10% de soro fetal bovino-GIBCO e 1% penicilina/ estreptomicina.

As amostras resultantes da centrifugação foram ressuspendidas em meio de cultivo, sendo posteriormente transferida para uma garrafa de cultivo de 25cm², que

estavam previamente preenchidas com meio de cultivo. (Figura 6-A, C e D). Cada garrafa de cultivo foi devidamente identificada com o meio de cultivo, dia, mês, procedência do material, número total de células e o nome do aluno responsável (Figura 6-B). Ambas foram encubadas na estufa Thermo Electron Corparation (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator HEPA Class 100) sob as condições de cultivo a 37,5° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ (Figura 6-E e F).

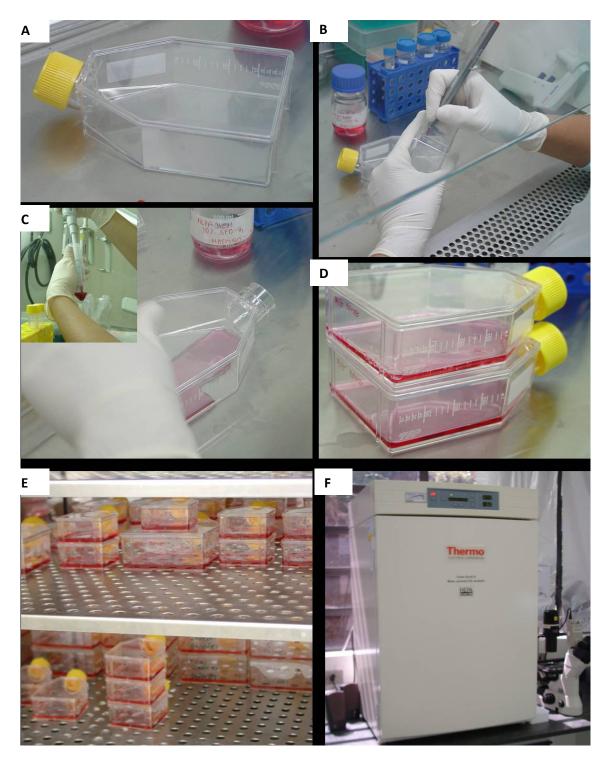


Figura 6 - Em A garrafa de cultivo (25cm²). B identificação das garrafas com dia, mês, o meio de cultivo, a quantidade de células e o material inoculado. C e D garrafas com o meio de cultivo e o material sendo inoculado. E garrafas sendo armazenadas na estufa de CO₂. F estufa Thermo Electron Corparation

4.6 Isolamento e cultivo de células do tecido adiposo

Com o objetivo de isolar as células-tronco mesenquimais, do tecido adiposo de ovinos "in vitro" foi necessária a realização de diversos ensaios, descrito abaixo, com vistas ao isolamentodas células mononucleares do tecido adiposo.

Todo o procedimento de separação de células mononucleares ocorreu dentro do fluxo laminar MINIFLOW I de forma que os materiais utilizados, a superfície de contato e o ambiente estivessem esterilizados, reduzindo assim as chances de qualquer tipo de contaminação das amostras e dos meios de cultivo.

4.6.1 Protocolo 1

Foi realizado uma lavagem com PBS e após o material foi cortado em pedaços de 50 mm³. Esses fragmentos foram incubados em solução de PBS com 0,05% de colagenase durante 90 minutos a 37ºC. Terminado esse período, a suspensão de células resultante foi filtrada através de uma malha *mesh* de 100 μm.

O resultado do filtrado foi centrifugado a temperatura ambiente durante 10 minutos a 600g na centrifuga Rotina 46R (Hettich Zentrifugen). O *pellet* formado foi ressuspenso em meio de cultura, onde realizou-se mais 3 lavagens do material. Depois da lavagem, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura e mantidas na estufa Thermo Electron Corparation (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator HEPA Class 100) sob as condições de cultivo a 37°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.6.2 Protocolo 2

Foi realizado uma lavagem com PBS e após, o material foi cortado em pedaços de 50 mm³. Esses fragmentos foram incubados em solução de PBS com 0,05% de colagenase durante 45 minutos a 37ºC. Terminado esse período, a

suspensão de células resultante será filtrada através de uma malha *mesh* de 100 µm.

O resultado do filtrado será centrifugado a temperatura ambiente durante 10 minutos a 600g na centrifuga Rotina 46R (Hettich Zentrifugen). O *pellet* formado será ressuspenso em meio de cultura, onde realizou-se mais 3 lavagens do material. Depois da lavagem, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura e mantidas na estufa Thermo Electron Corparation (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator HEPA Class 100) sob as condições de cultivo a 37°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.6.3 Protocolo 3

Esse protocolo foi realizado de forma semelhante ao protocolo 2, no qual se diferencia, pois ao invés de utilizar a colagenase utilizou-se a tripsina. O restante do processo foi o mesmo.

4.6.4 Protocolo 4

Esse protocolo foi realizado seguindo o protocolo 1, onde nesse protocolo, também foram plaqueados pequenos fragmentos de tecido adiposo.

5 **RESULTADOS**

5.1 Coleta do sangue do cordão umbilical

A coleta do sangue do cordão umbilical foi realizada através de procedimento cirúrgico devido à característica de a ovelha parir em ambientes onde não exista ameaça a sua prole, que geralmente ocorre durante a noite ou inicio da manhã. Entretanto foram feitos testes de punção direta de cordão umbilical após parto e expulsão da placenta, não obtendo assim, quantidade e qualidade de material para cultivo celular.

Durante a realização do procedimento, foi encontrada uma complicação no momento da coleta do sangue, pois na primeira coleta a agulha usada foi de calibre 24x07 que após a retirada dela do vaso gerou um sangramento que foi facilmente estancado por compressão digital. Foi realizada a substituição da agulha por uma de calibre menor (8x0,3, "insulina"), que não gerou mais sangramento ao final da coleta. Durante todo o procedimento, os parâmetros vitais maternos foram monitorados, sendo que, traçado eletrocardiográfico não apresentou alterações, e o animal foi mantido em ventilação espontânea com boa saturação de oxigênio durante todo o período anestésico. Durante o ato cirúrgico, o feto permanecia vivo, e foi possível a sentir do pulso pré-cordial.

O procedimento mostrou-se, também, inócuo ao feto e fêmea, pois a gestação foi a termo sem a necessidade de intervenção médico veterinário e nenhuma complicação puerperal (Figura 7-A, B, C, D).

Nos procedimentos onde se realizou a cesariana, não foi encontrado nenhuma complicação trans- ou pós-operatória.



Figura 7 - Fotografias evidenciando cordeiro no dia do nascimento após 11 dias do procedimento para a coleta do sangue do cordão umbilical. Em A evidenciamos a fração do cordão aderido à mãe. B e C mostram o cordeiro amamento e na figuraD evidenciamos a viabilidade do cordeiro pósparto

5.2 Cultivo celular das células de sangue umbilical

As células derivadas do sangue de cordão umbilical, provenientes dos protocolos de separação de células mononucleares por gradiente de densidade Ficoll Hipaquitm Plus (Protocolos 1 e 2) demonstraram resultados não satisfatórios, porém como as células sanguíneas totais derivadas do Protocolo 3, demonstraram resultados melhores quanto ao cultivo e expansão de células-tronco mesenquimais, mas ainda não são satisfatórios.

Estas células foram mantidas em cultivo por um período de 15 dias, encubadas em estufa Thermo Electron Corparation (Forma Series II Water Jacketed CO₂

Incubator HEPA Class 100) sob as condições de 37,5°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂, com os três meios de cultivo mencionado anteriormente (Meios 1, 2 e 3).

As células do cordão de ovinos foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² em várias concentrações celulares: 2,5x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶. O meio de cultivo adicionado no dia 0, ou seja, no primeiro dia cultivo, foi retirado e desprezado juntamente com as células flutuantes em cultura em 4 períodos diferentes sendo eles: 24, 72, 96 e 120 horas após o plaqueamento celular.

Para complementar o estudo as garrafas foram avaliadas em períodos alternados (24; 72; 106; 192; 240/ 264 e 298 horas), para acompanhar e verificar o momento exato da adesão celular ao substrato, assim como crescimento destas células *in vitro*.

Através das condutas adotadas e mencionadas acima, observamos que as culturas celulares derivadas do sangue umbilical, eram compostas somente por inúmeras células circulares pequenas não aderentes, dentre esta população uma grande fração era composta por hemácias. Em quase todas as tentativas mencionadas, não foi possível observar a adesão e expansão das células-tronco mesenquimais, visto que um dos fatores para a sua expansão em cultura é a capacidade de adesão ao substrato (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Somente foi possível, o isolamento de células com características mesenquimais, na quinta amostra, onde foi repetido o Protocolo 1 com uso do Alfa-MEM como meio de cultura. Essas células apresentaram um crescimento rápido e morfologicamente eram fibroblastóides. Porém, após a primeira passagem as células não apresentaram mais crescimento e a cultura não progrediu (Figura 12 – A e B).

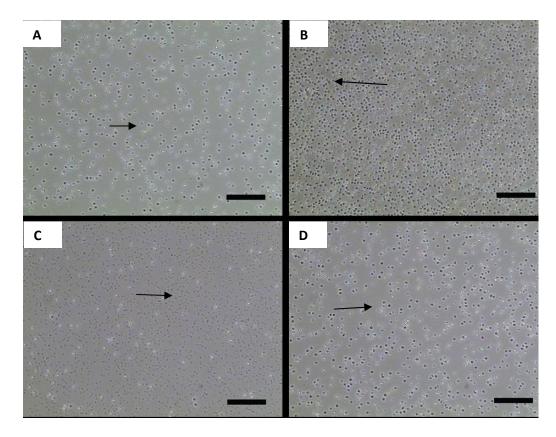


Figura 8 - Fotomicrografia das células do cordão umbilical de ovinos em cultivo Protocolo 1. Fotomicrografias realizadas em períodos alternados. Observar a presença de células pequenas circulares não aderentes (seta). Em A, B e C células expandidas em meio de cultivo ALFA-MEM suplementado com SFB-GIBCO com 48 horas de cultivo; 192 horas em B, 240 horas em C e com 264 horas em D em meio DMEM-L suplementado com SFB-GIBCO. Barra= 50μm

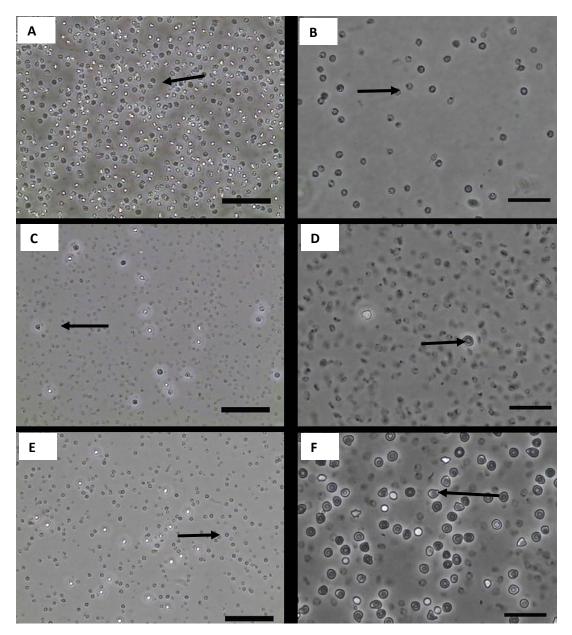


Figura 9 - Fotomicrografias das células de sangue cordão umbilical de ovinos provenientes do Protocolo 2. A, C e E período de 288 horas de cultivo enquanto que em B, D e F período de 408 horas. A e B células cultivadas em meio Alfa-MEM suplementado com SFB-GIBCO e C e D meio DMEM-H suplementado com SFB-GIBCO e em E e F meio DMEM-L suplementado com SFB-GIBCO. As imagens acima permitem a visualização de células inviáveis quanto ao crescimento e aderência ao meio de cultivo (setas). Barra = 25μm

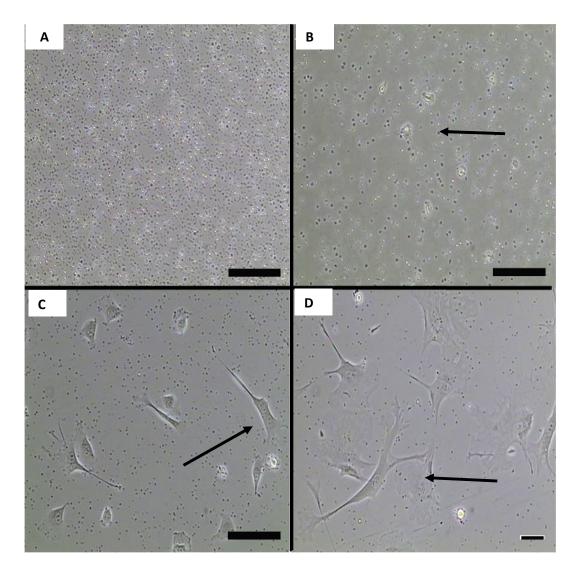


Figura 10 - Fotomicrografias das células de sangue de cordão umbilical de ovinos provenientes da repetição do Protocolo 2. A, B, C e D com meio DMEM-H suplementado com SFB-GIBCO e com tempo de cultivo de, respectivamente, 168, 336, 696 e 888 horas. Em B a seta indica célula aderida. Em C e D as setas indicam as células mesenquimais isoladas do sangue de cordão. Barra = 50 μm

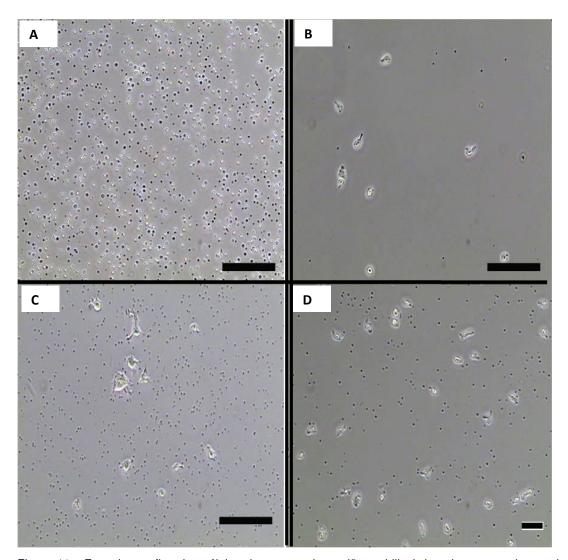


Figura 11 - Fotomicrografias das células de sangue de cordão umbilical de ovinos provenientes do Protocolo 3. A, B, C e D com meio Alpha-MEM suplementado com SFB-GIBCO e com tempo de cultivo de, respectivamente, 168, 336, 696 e 840 horas. Em B, C e D as setas indicam células aderidas que potencialmente podem ser células mesenquimais. Barra = $50~\mu m$

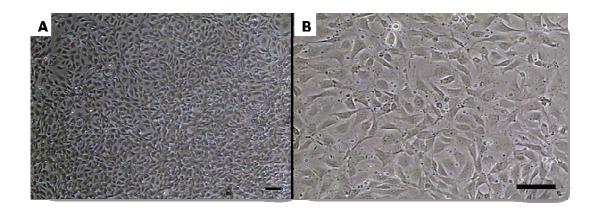


Figura 12 - Fotomicrografias das células de sangue de cordão umbilical de ovinos provenientes da repetição do Protocolo 3. A e B com meio Alpha-MEM suplementado com SFB-GIBCO e com tempo de cultivo de 504 horas. Barra = 50 μm. A = 40x e B = 200x

5.3 Coleta do tecido adiposo

A coleta do tecido adiposo foi realizada através de procedimento cirúrgico devido à característica do ovino possuir pouco tecido adiposo na região subcutânea e ter um depósito de quantidade satisfatória na região peri-renal.

Durante todo o procedimento, os parâmetros vitais foram monitorados, sendo que, traçado eletrocardiográfico não apresentou alterações, e o animal foi mantido em ventilação espontânea com boa saturação de oxigênio durante todo o período anestésico. Representando assim um procedimento seguro e de fácil execução, no qual não houve nenhum tipo de complicação trans- ou pós- operatória.

5.4 Cultivo celular das células de tecido adiposo

A primeira tentativa do isolamento de células mesenquimais do tecido adiposo foi realizada seguindo o protocolo 1 descrito acima, no qual tratava-se de uma protocolo de digestão química do tecido adiposo e posterior isolamento por aderência ao plástico da garrafa de cultura. O material foi mantido em cultura por

240 horas, onde não apresentou nenhum tipo de isolamento ou crescimento do tipo celular desejado (Figura 13).

Na segunda tentativa, foi realizado uma variação do protocolo 1 chamado aqui de protocolo 2, diminuindo o tempo de digestão química pela metade. Nesse protocolo, consegui-se a aderência de células. Essas células tinham uma característica esférica e refringente (Figura 14). Mas, novamente, com 240 horas de cultivo essas células morreram ou apresentaram uma diferenciação para um tipo celular não desejado.

O protocolo 3, diferenciava-se do protocolo 2, apenas pelo uso da tripsina ao invés do uso da colagenase, no momento da digestão química. Porém os resultados foram idênticos aos apresentados pelo protocolo 1, onde as células não aderiram e em 10 dias de cultivos não havia mais células viáveis (Figura 15).

O protocolo 4, no qual variou do protocolo 1, apenas pela presença de pequenos fragmentos de tecido adiposo, apresentou resultados mais satisfatórios. O protocolo 4 foi utilizado em duas amostras. A primeira tentativa, a cultivo celular apresentou contaminação fúngica, inviabilizando o cultivo. Na segunda amostra, houve a aderência celular à garrafa de cultivo. Após 360 horas de cultivo, foi identificada a presença de células com característica morfológica fibroblastóide e rápido crescimento (Figura 16). Nesse cultivo, depois de apresentar confluência mínima, foi realizado o requipe. Mas de forma semelhante à primeira amostra desse protocolo, o cultivo contaminou e as células tornaram inviáveis.

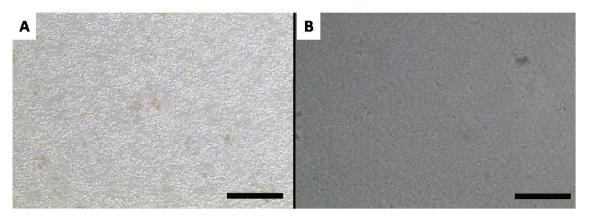


Figura 13 - Fotomicrografías referente ao protocolo 1 de isolamento de células de tecido adiposo. A 24 horas após o isolamento. B 240 horas após o isolamento sem nenhuma célula viável. Barra = 50 μm. A e B = 100x

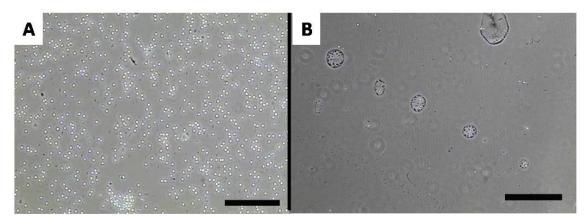


Figura 14 - Fotomicrografias referente ao protocolo 2 de isolamento de células de tecido adiposo. **A** 24 horas após o isolamento. **B** 240 horas após o isolamento, notar a presença de células inviáveis e com aspecto morfológico não desejável . Barra = 50 μm. **A** e **B** = 100x

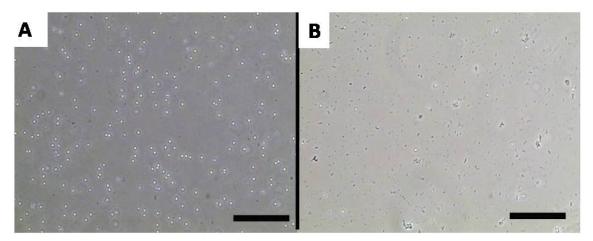


Figura 15 - Fotomicrografias referente ao protocolo 3 de isolamento de células de tecido adiposo. **A** 24 horas após o isolamento. **B** 240 horas após o isolamento sem nenhuma célula viável. Barra = 50 μm. **A** e **B** = 100x

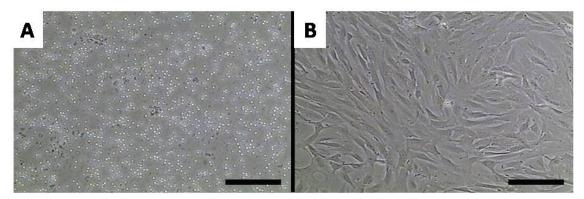


Figura 16 - Fotomicrografias referente ao protocolo 4 (segunda amostra) de isolamento de células de tecido adiposo. **A** 24 horas após o isolamento. **B** 360 horas após o isolamento com células com característica morfológica fibroblastóide. Barra = 50 μm. **A** e **B** = 100x

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a melhor fonte de célulastronco mesenquimais, avaliando a facilidade de obtenção, isolamento e sua caracterização para futuro uso em terapias regenerativas e formação de banco de células.

Este tópico será divido de acordo com a fonte estudada afim de facilitar a compreensão.

6.1 Coleta e isolamento de células de sangue de cordão umbilical

A coleta do sangue de cordão umbilical foi realizada através de procedimento cirúrgico e posteriormente acondicionada em seringas contendo heparina sódica seguindo o mesmo protocolo descrito por Fuchs et al. (2005) e a técnica descrita por Hecker (1974). As coletas foram realizadas sem nenhum tipo de complicação anestésico-cirúrgica e o uso da heparina sódica como anticoagulante mostrou-se eficiente, sendo que nenhuma amostra apresentou alteração que inviabilizasse seu uso nos protocolos de isolamento testados, mantendo as células viáveis.

Na literatura só existem duas descrições do isolamento de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical de ovinos realizada por Fuchs et al. (2005) e Jager et al. (2006), porém a equipe do segundo autor coletou o sangue oriundo dos placentônios. A coleta das amostras deste trabalho foi feita dos vasos que compõem o cordão umbilical intra uterino e que foi muito satisfatório, entretanto, não foi possível coletar sangue diretamente dos placentônios, pósparto, tentativa esta feita a priori pelo nosso grupo.

Os protocolos usados no isolamento das células do sangue de cordão umbilical diferiam entre si, basicamente, na velocidade e tempo de centrifugação, pois a maior dificuldade encontrada durante esse processo foi a eliminação das hemácias, pois o ovino apresenta o hematócrito e a concentração de hemácias

superior ao de humanos e cães (GASPER, 2000) , os quais possuem mais trabalhos na literatura e portanto protocolos mais eficientes.

O primeiro protocolo usado era um protocolo usado para medula óssea de ovinos do Laboratório de Células-Tronco da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FEITOSA, 2008). Este protocolo mostrou totalmente ineficiente, onde não houve aderência de nenhum tipo celular ao plástico e todas as células tornaram inviáveis.

O segundo protocolo testado seguia o descrito por Fuchs et al. (2005), mas os resultados discordavam com os apresentados em seu estudo, pois não houve a formação do *pellet* de células mononucleares e sim um discreto halo esbranquiçado; e com uma só lavagem não era possível retirar todo as hemácias sobrenadantes. Em uma segunda amostra houve a aderência ao plástico, porém de um número insignificante de células de morfologia fibrobalstóide, mostrando o insucesso do protocolo. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelos resultados apresentados por Secco et al. (2008a), onde a partir de dez amostras a autora só obteve dez por cento de sucesso no isolamento de células mesenquimais a partir do sangue de cordão umbilical humano.

O terceiro protocolo seguiu o protocolo de Zucconi (dados não publicados), o qual era utilizado para o isolamento de células mesenquimais de sangue de cordão umbilical em cães. Na primeira amostra a cultura apresentou uma maior quantidade de células aderidas, que começaram a adquirir a morfologia fibroblastóide, porém tornaram-se inviáveis após 30 dias de cultura.

Na segunda amostra do protocolo 3, houve sucesso no isolamento de células com características morfológicas de células-tronco mesenquimais, onde elas expandiram e apresentaram confluência suficiente para realizar a primeira passagem, que após realizada, elas pararam de expandir e tornaram inviáveis. Provavelmente esse resultado corrobore com os dados de Secco et al. (2008a) onde a amostra possuia maior quantidade de células.

6.2 Coleta e isolamento de células de tecido adiposo

A coleta do tecido adiposo foi escolhida segundo o estudo de Knippenberg et al. (2006) que usou caprinos em seu estudo. Essa escolha foi feita baseada na semelhança anatômica e fisiológica entre caprinos e ovinos. Em humanos geralmente é realizada a lipectomia ou lipoaspiração por motivos geralmente plásticos e facilita o acesso às amostras de gordura (ZUK et al., 2001). Essa técnica foi escolhida pois os ovinos geralmente não apresentam acumulo de tecido adiposo no sub-cutâneo, e sim nas vísceras intraabdominais.

Durante a coleta do tecido adiposo peri-renal, não houve nenhuma complicação, igual relatada por Knippenberg et al. (2006). Mostrando-se um procedimento de fácil realização e sem necessidade de grande habilidade cirúrgica e nenhuma complicação pós-operatória.

O primeiro protocolo usado foi o mesmo usado por Knippenberg et al. (2006), devido as semelhanças supra-citadas. Porém após 10 dias de culturas todas as células se inviabilizaram. Isso ocorreu devido a quantidade de tempo de digestão enzimática, que possivelmente difere do modelo caprino.

No segundo protocolo foi reduzido o tempo de digestão enzimática pela colagenase pela metade, afim de se testar se o tempo proposto por Knippenberg et al. (2006) em caprinos era superior ao de ovinos. O resultado observado foi uma maior quantidade de células aderida ao plástico da garrafa de cultura, porém morfologicamente esférica, que após 10 dias de cultura não apresentaram mais refringência indicando a sua inviabilidade.

No terceiro protocolo foi usado a tripsina, afim de fazer a digestão química e isolar as células mesenquimais do tecido adiposo. Essa tentativas foi feita de maneira empírica, mais uma vez, sendo que não há nenhum relato na literatura da descrição da digestão enzimática do tecido adiposo de ovinos com uso de tripsina. Esse protocolo apresentou uma quantidade de células esférica, refringentes aderidas ao plástico da garrafa de cultura que após dez dias de cultura tornaram inviáveis apresentando características de células de linhagens ósseas.

O quarto protocolo foi testado duas vezes. Nesse protocolo foi feito junto com a digestão química o explante do tecido adiposo. Na primeira tentativa houve contaminação fúngica intensa. Na segunda tentativa houve uma grande aderência

de células morfologicamente caracterizadas esféricas, refringentes e aderentes que após 20 dias de cultura adquiriram a morfologia fibroblastóide e crescimento característico de células mesenquimais. Porém igual ao ocorrido às células do sangue de cordão umbilical, após a primeira passagem as células morreram.

Conclusões 53

7 CONCLUSÕES

 A técnica cirúrgica utilizada para a coleta de sangue de cordão umbilical é factível de ser realizada, mostrando inócua ao feto e a fêmea gestante, desde que a equipe possua habilidade anestésico-cirurgica para realização desse tipo de procedimento.

- A técnica cirúrgica para coleta de tecido adiposo peri-renal, mostrou-se de fácil realização, sem a necessidade de grande habilidade cirúrgica. É também uma técnica que não apresentou nenhuma complicação pósoperatória.
- 3. O protocolo de isolamento de células de sangue de cordão umbilical que se mostrou mais eficiente foi o mesmo usado no modelo canino, o que mostra que o modelo ovino carece de mais estudos, pois ele é um excelente modelo para a pesquisa ortopédica, onde a medicina regenerativa apresenta os resultados mais promissores.
- 4. O protocolo de isolamento de células de tecido adiposo mostrou mais eficiente quando houve o explante de células. Para o isolamento de células de tecido adiposo é muito importante a assepsia, pois é um tecido o qual apresenta contaminação com muita facilidade, diferentemente do sangue de cordão umbilical no qual o melhor meio foi o Alfa-MEM.
- 5. Estes dois tipos de células-tronco mesenquimais obtidas mostraram sua morfologia típica fibloblastoide, entretanto, teste de diferenciação celular não foram eficazes no momento de expansão tecidual.

REFERÊNCIAS

- BARKER, J. N.; WAGNER, J. E. Umbilical cord transplantation: current practice and future innovations. **Criticals Reviews in Oncology/Hematology**, v. 48, p.35-43, 2003.
- CARDOSO, F. P.; GONZÁLEZ, J. H.; EZQUERRA, E. A. Utilización de células madre para la regenación miocárdica em la insuficiência cardíaca. **Revista española de cardiologia,** v. 56, n. 10, p. 935-939, 2003.
- CHANG, Y.; TSENG, C.; HSU, L.; HSIEH, T.; HWANG, S. Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. **Cell Biology International**, v. 30, p. 495-499, 2006.
- COHEN, Y.; NAGLER, A. Umbilical cord blood transplantation how, when and for whom? **Blood Reviews**, v. 18, p. 167-169, 2004.
- DIMITRIOU, H.; MATSOUKA, C.; PERDIKOYANNI, C.; STIAKAKI, E.; BOLONAKI, I.; LYDAKI, E.; KOUMANTAKIS, E.; KALMANTI, M. Phenotypic characteristics of blood cord hemopoietic cell. **Leukemia Research**, v. 22, p. 755-758, 2004.
- DUNCOMBE, G. J.; BARKER, A. P.; MOSS, T. J. M.; GURRIN, L. C.; CHARLES, A. K.; SMITH, N. M.; NEWNHAM, J. P. The effects of overcoming experimental bladder outflow obstruction in fetal sheep. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine,** v. 11, n. 2, p. 130-137, 2002.
- ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology**, v. 109, p. 235-242, 2000.
- FEITOSA, M. L.T. **Transplante heterólogo de células-tronco mesenquimais em ovinos com osteonecrose da cabeça do fêmur induzida**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- FRASER J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends In Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 150-155, 2006.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KALAJINA, N. N. Fibroblast precursor in normal end irradiated mouse. hematopeitic organs. **Experimental Hematology**, v, 4, p, 267-274, 1974.
- FUCHS, J. R.; HANNOUCHE, D.; S. SARVENAZ, TERADA, S.; ZAND, S.; VACANTI, J. P.; FAUZA, D. O. cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. **Stem Cells**, v. 23, p. 958-964, 2005.

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

- HECKER, J. H. Intra-uterine surgery. In:______. **Experimental surgery in small ruminants**. London: Butterwoths, 1974. cap. 14, p. 235-255.
- JAGER, M.; BACHMANN, R.; SCHARFSTADT, A.; KRAUSPE, R. Ovine cord blood accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells. **In Vivo,.** v. 20, n. 2, p. 205-214, 2006.
- KANG, X.; ZANG, W.; BAO, L.; LI, D.; XU, X.; YU, X. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Cell Biology International**, v. 30, p. 569-575, 2006.
- KNIPPENBERG, M.; HELDER, M. N.; ZANDIEH DOULABI, B.; WUISMAN, P. I. J. M.; KLEIN-NULEND, J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 902-908, 2006.
- LEE, O. K.; KUO, T. K.; CHEN, W. M.; LEE, K. D.; HSIEH, S. L.; CHEN, T. H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, v. 103, p. 1669-1675, 2004.
- MANGGOLD, J.; SERGI, C.; BECKER, K.; LUKOSCHEK, M.; SIMANK, H. G. A new animal model of femoral head necrosis induced by intraosseous injection of ethanol. **Laboratory Animals**, v. 36, p. 173-180, 2002.
- MARESCHI, K.; BIASIN, E.; PIACIBELLO, W.; AGLIETTA, M.; MADON, E.; FAGIOLI, F. Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. **Haematologica**, v. 86, p. 1099-1100, 2001.
- PARK, K.; LEE, Y.; KANG, K. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. **Journal of Veterinary Science**, v. 7, n. 4, p. 343-348, 2006.
- POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. **International Journal of the Care of the Injured**, v. 365, p. S8-S12, 2005.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase c (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 130-139, 1966.
- RODBELL, M.; JONES A. B. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase c (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 140-142, 1966.
- ROMANOV, Y. A.; SVINTSITKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human Mesenquimal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem cells**, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2003.

SECCO, M.; ZUCCON, I. E.; VIEIRA, N. M.; FOGAÇA, L. L.; CERQUEIRA, A.; CARVALHO, M. D.; JAZEDJE, T.; OKAMOTO, O. K.; MUOTRI, A. R.; ZATZ, M. Mesenchymal stem cells from umbilical cord: do not discard the cord!

Neuromuscular Disorders, v. 18, n. 1, p. 17-18, 2008a.

- SECCO, M.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; FOGAÇA, L. L. Q.; CERQUEIRA, A.; CARVALHO, M. D. F.; JAZEDJE, T.; OKAMOTO, O. K.; MUOTRI A. R.; ZATZ, M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!. **Stem Cells,** v. 26, p. 146-150, 2008b.
- VAN, R. L.; BAYLISS, C. E.; RONCARI, D. A. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 58, p. 699-704, 1976.
- WALDLOW, R. C.; PORTER, D. L. Umbilical cord transplantation: where do we stand? **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 8, p. 637-647, 2002.
- WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J. M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. **British Journal of Haematology**, v. 121, p. 368-374, 2003.
- ZUK, P. A.; ZHU, ASHJIAN, P.; UGARTE, D. A.; HUANG, J.; 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. 4279-4295, 2002.
- 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: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering,** v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.