

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MULTIPOTENTES OBTIDAS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSITO DE EQUINOS

Mambelli, L.I.¹, Lizier, N.F.¹, Santos, E.J.C.¹, Wolff, T.W.²

¹ CELLTROVET – Atividades Veterinárias Ltda.; ² Jockey Club São Paulo; São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: lisleymambelli@celltrovet.com.br

Isolamento



Figura 1. Isolamento de células-tronco a partir de tecido adiposo de equinos (A-E). (B) Biópsia de gordura de cavalo. (C) Os fragmentos de gordura foram lavados e digeridos enzimaticamente por colagenase tipo IV. (D) Explante do tecido. (E) Células com morfologia semelhante a fibroblastos isoladas a partir do explante de tecido adiposo de equinos.

Morfologia das CTTAe e Curva de Crescimento

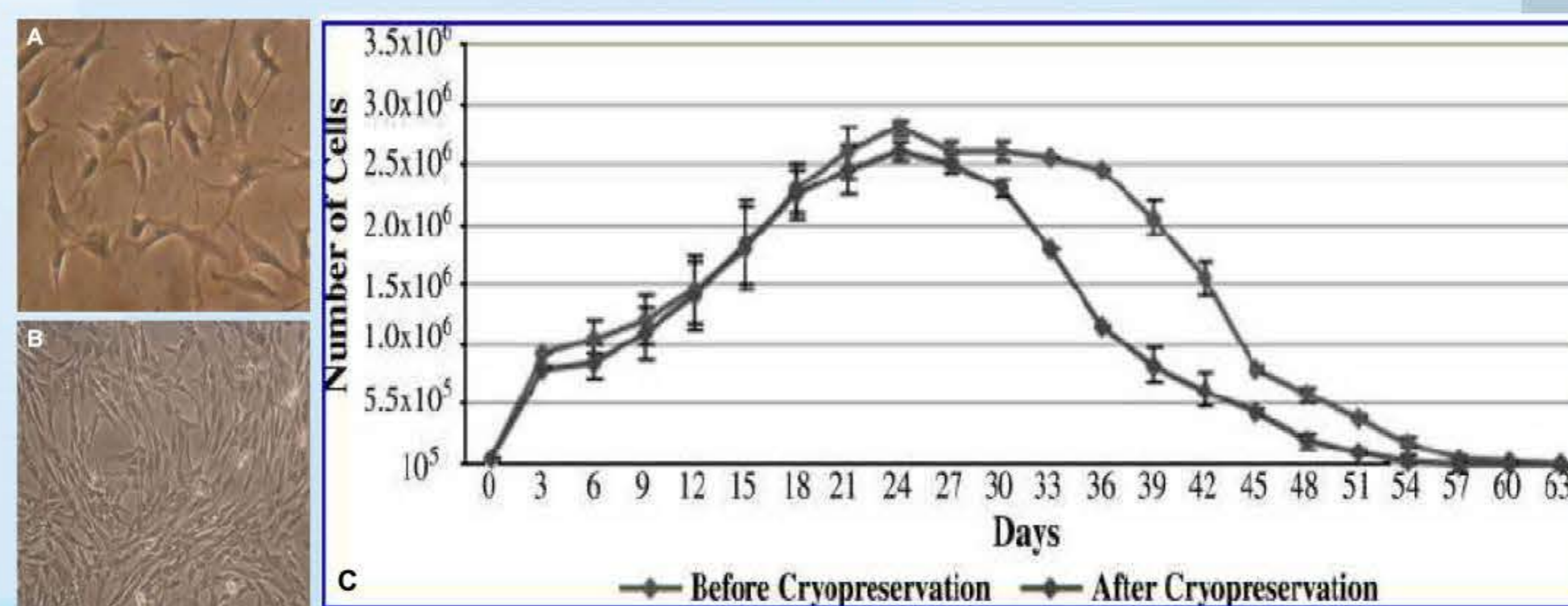


Figura 2. Morfologia das CTTAe em diferentes passagens P2 (A) e P20 (B). O potencial proliferativo destas células foi avaliado pelo método da curva de crescimento antes e após o processo de criopreservação (C).

Diferenciação Osteogênica

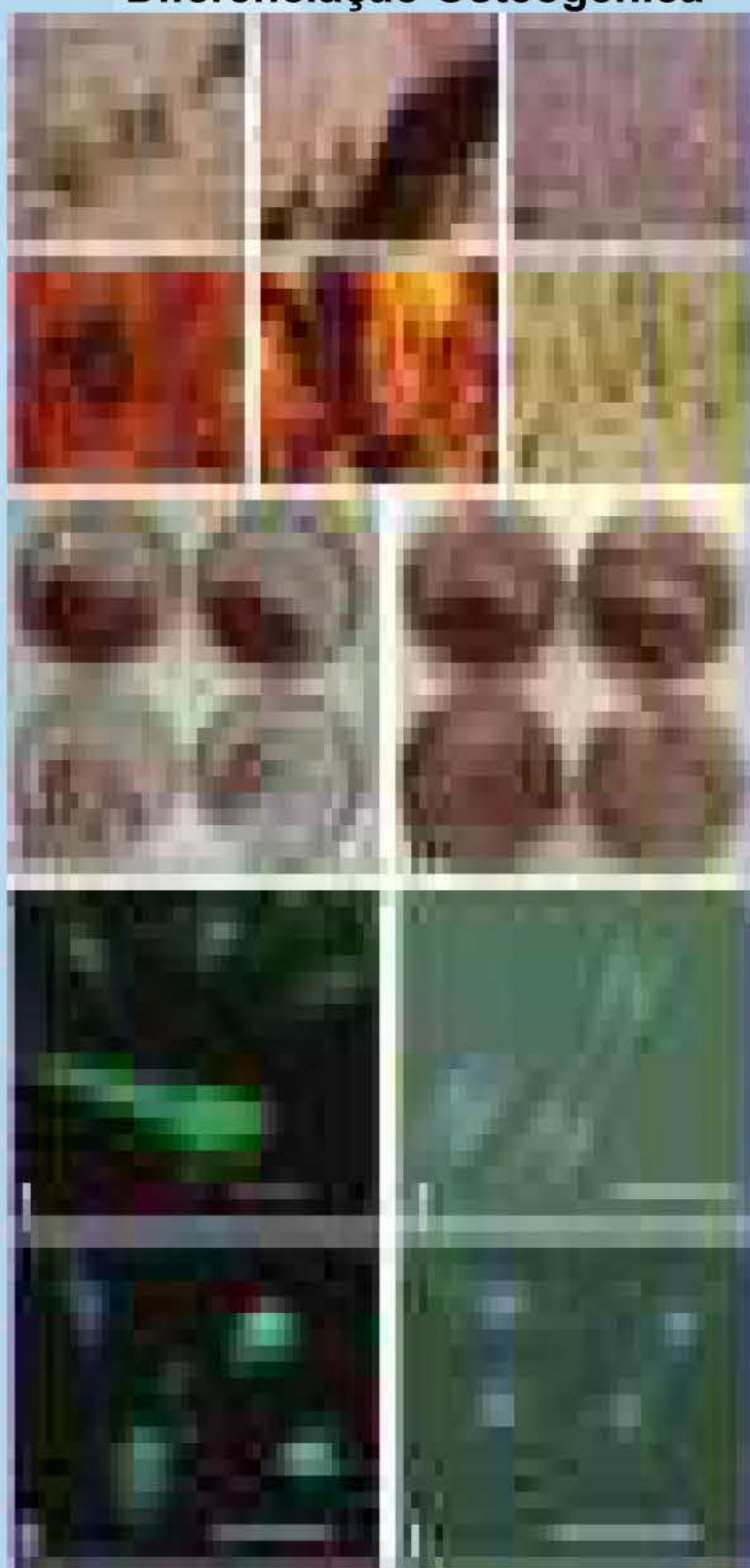


Figura 3. Diferenciação osteogênica antes (A-C, G) e após (D-F, H) o processo de criopreservação. (A) Início da mineralização da matriz extracelular com 11 dias de diferenciação. (B) Forte mineralização após 21 dias. (C) Células cultivadas (21 dias) em meio controle não apresentam nenhum sinal de mineralização. Coloração de Von kossa (D) aos 11 e (E) aos 21 dias. (F) Cultura controle corada por Von kossa (G, H). Vista macroscópica da diferenciação osteogênica antes (G) e após (H) criopreservação. Imunofluorescência contra anticorpos específicos para diferenciação osteogênica: anti-osteocalcina LF-32 (I) e anti-sialoproteína (K). As CTTAe indiferenciadas não reagem com os anticorpos propostos (J, L).

GFP

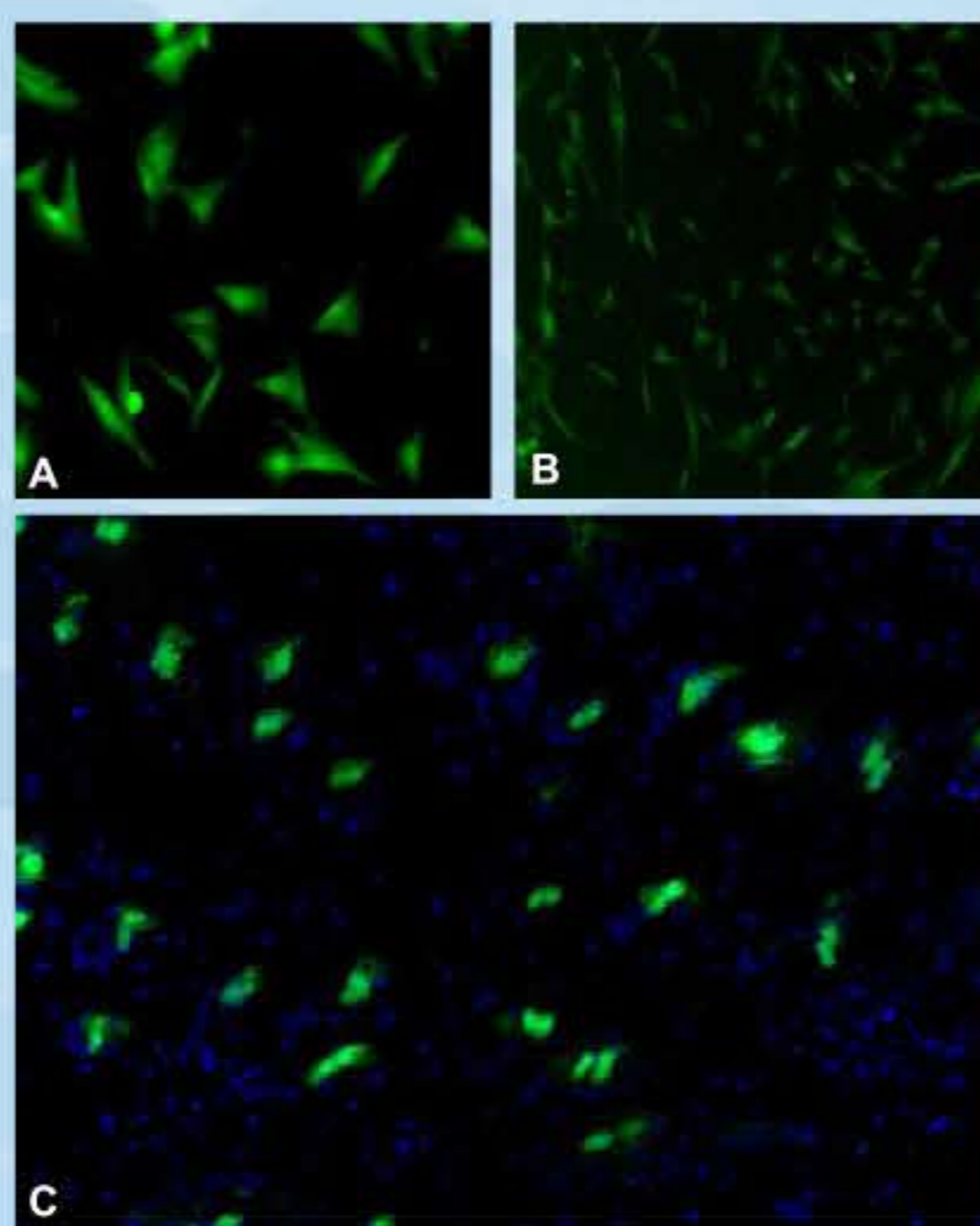


Figura 4. Células-tronco isoladas a partir de tecido adiposo de equinos (CTTAe) transduzidas com GFP (A-B). (C) CTTAe transduzidas com GFP encontradas na pele de camundongo.

Diferenciação Miogênica

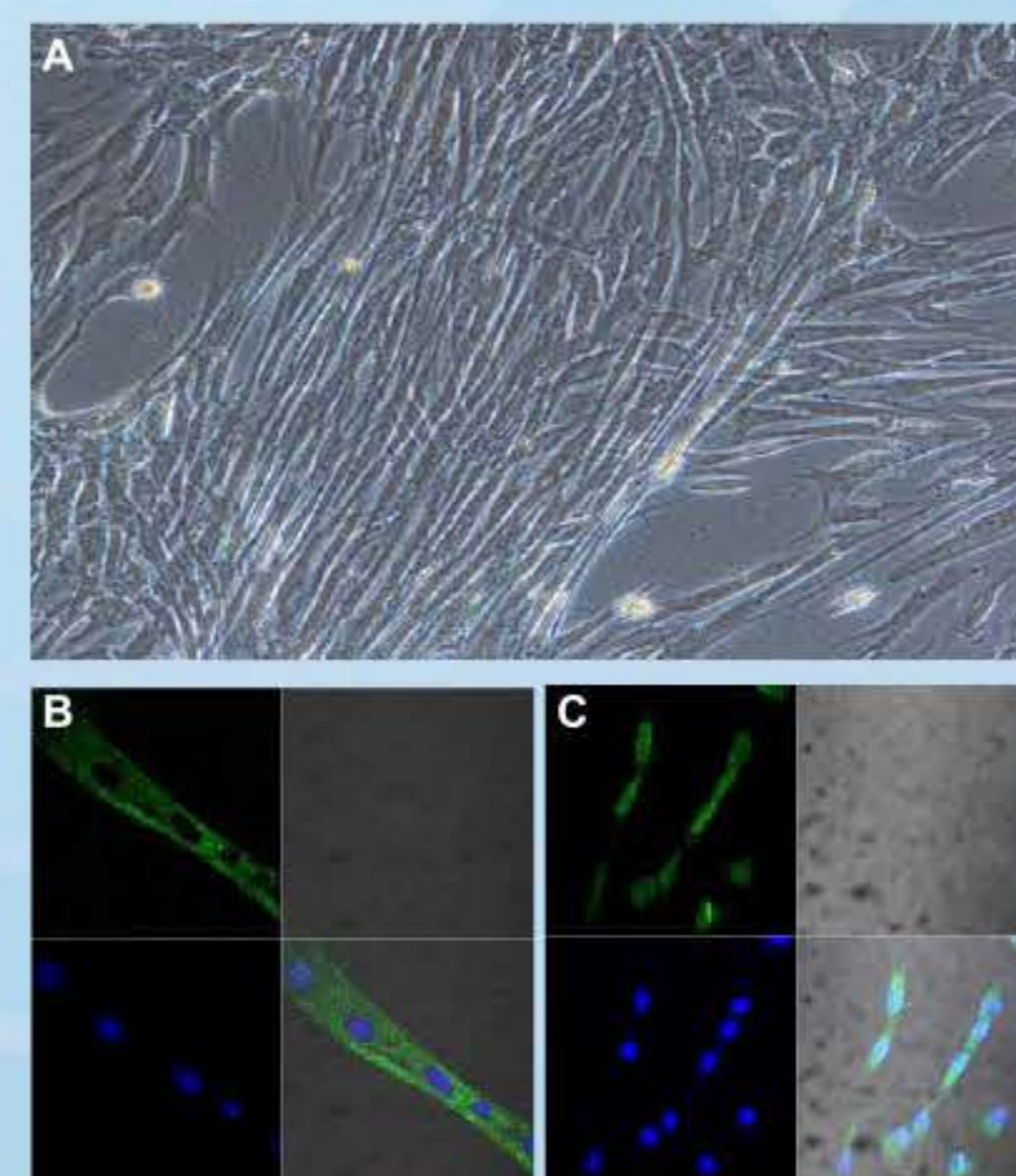


Figura 5. Diferenciação Miogênica (A-C). Cultura experimental não corada (A). Imunofluorescência contra anticorpos específicos: anti-miosina (B) e anti-MyoD1 (C). Núcleos corados por DAPI em azul.

Diferenciação Adipogênica

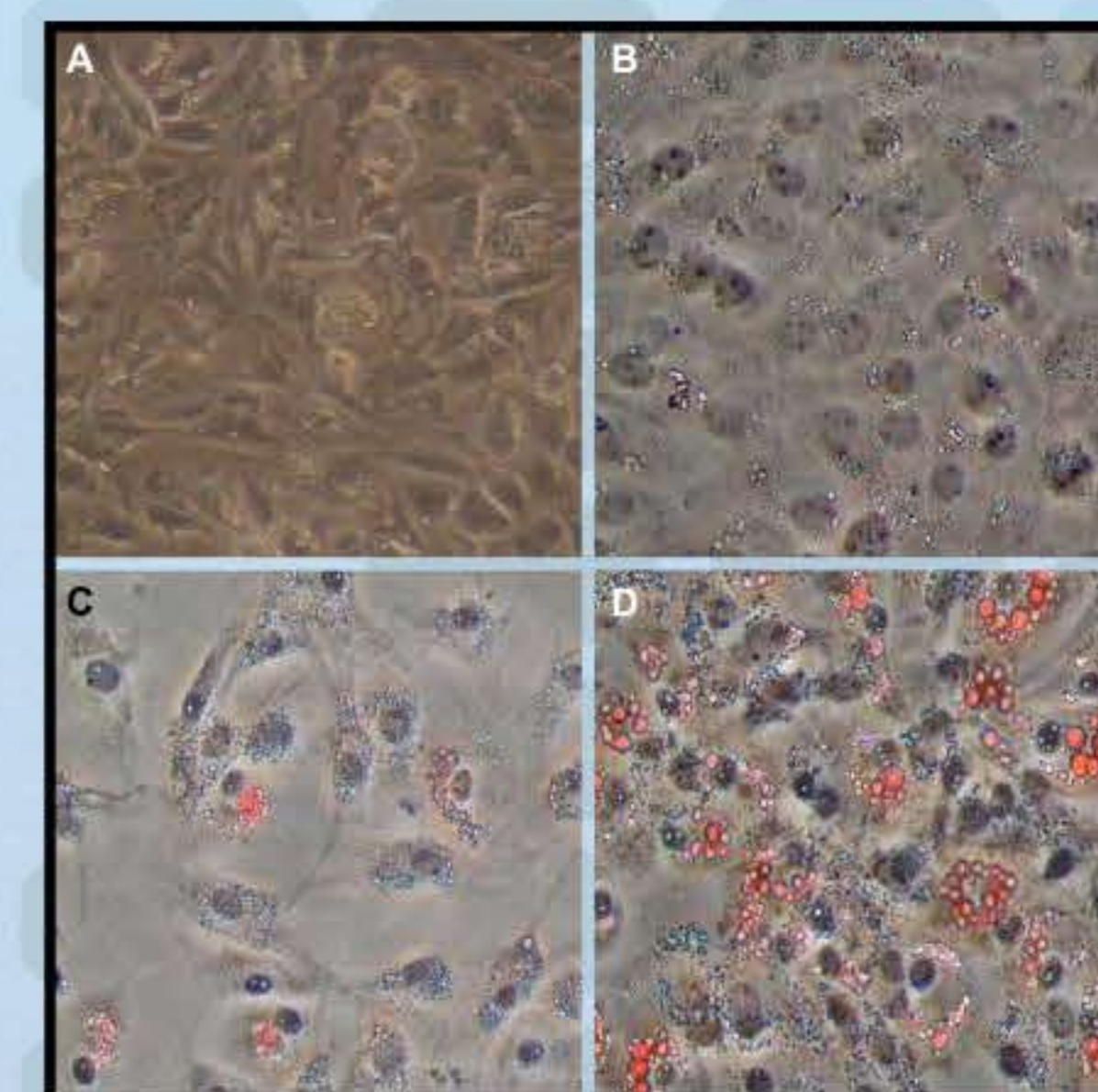


Figura 6. Diferenciação Adipogênica (A,C-D). Cultura experimental não corada (A) e cultura controle (B). Cultura experimental corada por Oil Red O, quatro (C) e sete (D) dias depois da indução da diferenciação osteogênica.

Diferenciação Condrogênica

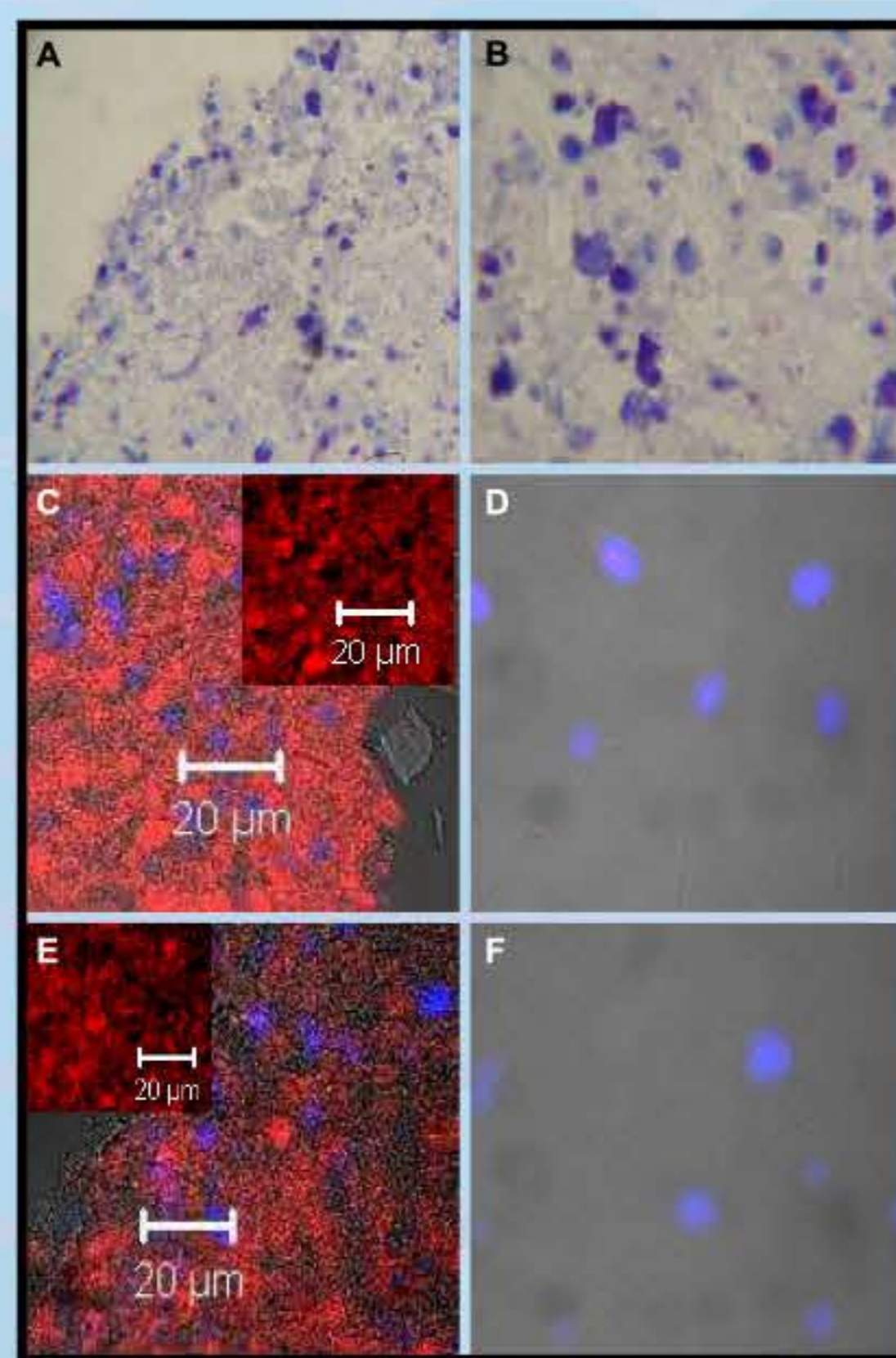


Figura 7. Diferenciação condrogênica tri-dimensional (A-C, E). (A-B) Coradas por azul de Toluidina. Análise de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos: anti-agrecan (C) e anti-colágeno tipo II (E). Os controles não reagiram com os mesmo anticorpos (D e F). Núcleos corados por DAPI em azul.

Diferenciação Neural

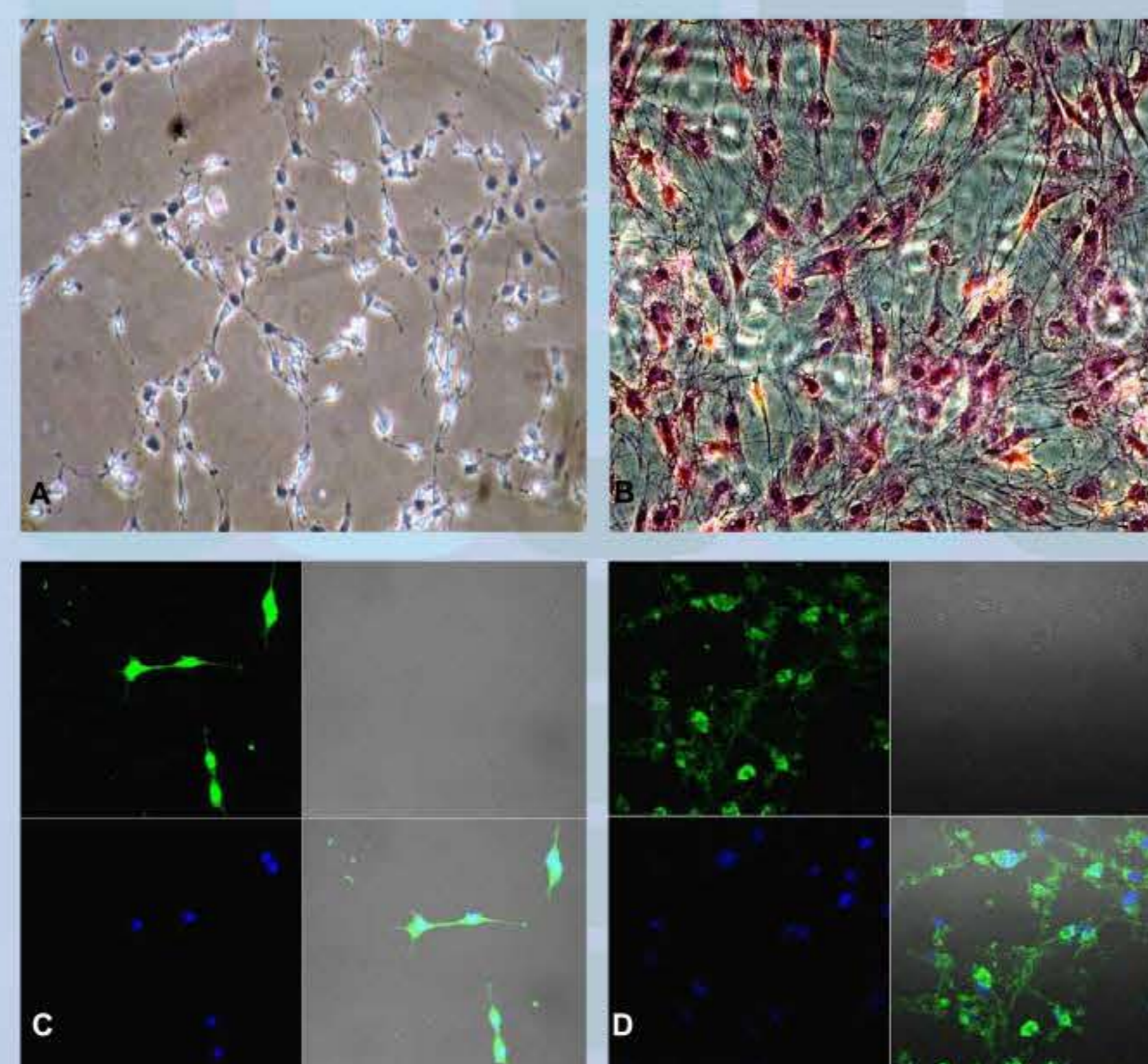


Figura 8. Diferenciação Neural (A-D). Cultura experimental não corada (A). Cultura experimental corada por hematoxilina e eosina (B). Análise de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos: anti-β-tubulina III (C) e GFAP (D). Núcleos corados por DAPI em azul.

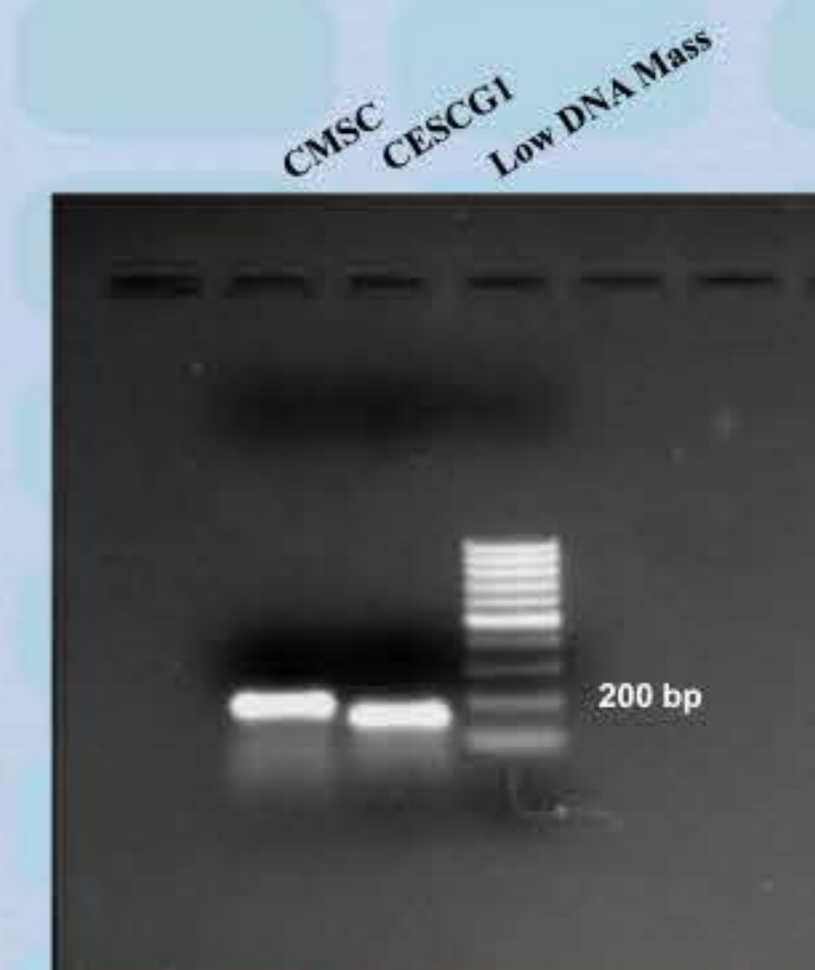


Figura 9. RT-PCR. Análise de expressão gênica associados a cavalo com marcadores mesenquimais (CMSC; 191bp) e embrionário (CESC1; 157bp).

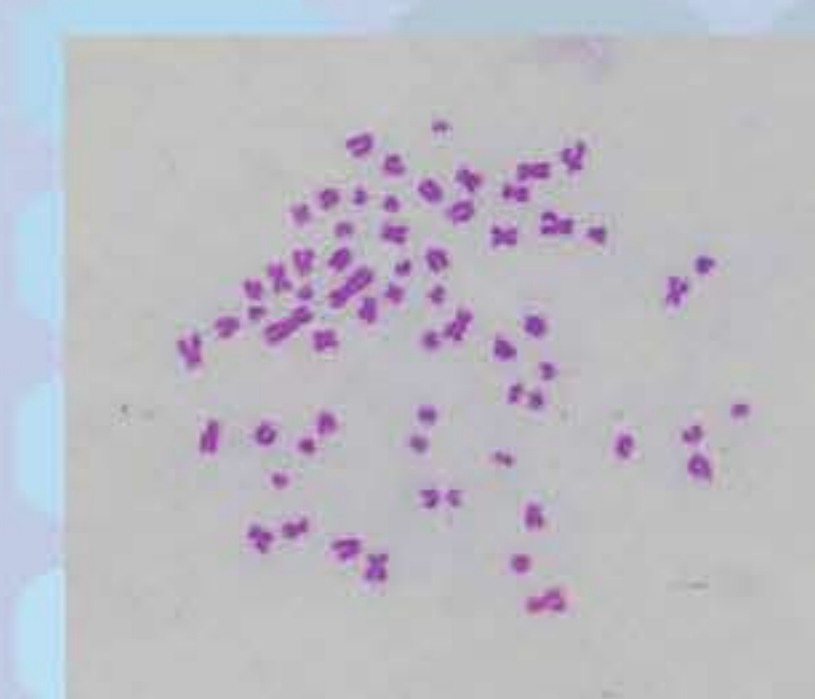


Figura 10. Análise de cariótipo das células tronco isoladas a partir de tecido adiposo de equinos coradas com Giemsa. Cariótipo normal (2n=64 cromossomos).

Introdução. As células-tronco (CTs) constituem uma população de células multipotentes com características singulares que as têm tornado extremamente atrativas para a medicina regenerativa. A aplicação terapêutica destas células em equinos é um campo emergente. Os animais atletas frequentemente sofrem injúrias dos ligamentos e tendões e portanto, CTs oferecem um instrumento que permite, na maioria dos casos, evitar a reincidência do trauma. O futuro da terapia celular, tal como a medicina regenerativa, depende de uma fonte de CTs multipotentes. Para a engenharia de tecido mesodérmico, uma fonte destas células é o estroma da medula óssea. Entretanto, a aquisição da medula óssea autóloga tem suas limitações. Uma fonte alternativa de células-tronco adultas que seja obtida em grandes quantidades, com um mínimo de desconforto possível ao animal, deverá ser vantajosa. Nosso grupo demonstrou o isolamento e a caracterização de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de equinos (CTM-TAe), bem como, analisou o efeito do processo de criopreservação nestas células (visando o estabelecimento de um banco de CTM-TAe). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o potencial de diferenciação, in vitro, das CTM-TAe.

Métodos. As CTM-TAe foram isoladas e mantidas como descrito previamente por Mambelli e colaboradores (2009). As diferenciações para músculo e células neurais foram induzidas e então confirmadas utilizando os anticorpos *mouse anti-human*: anti-miosina, anti-α-actinina, anti-MyoD1, anti-beta-III-tubulina; bem como os anticorpos *rabbit anti-human*: anti-nestina e anti-GFAP.

Resultados. Submetidas a diferenciação miogênica in vitro, as CTM-TAe apresentaram, após 10 dias, alterações morfológicas similares a células musculares. A expressão das proteínas: miosina, α-actinina e MyoD1 foi detectada por imunofluorescência, confirmando assim a funcionalidade das células musculares obtidas. Quando induzidas à diferenciação neural in vitro, após 11 dias, as células demonstraram alterações morfológicas com formação de axônios e deslocação nuclear. As CTM-TAe diferenciadas em células neurais reagiram positivamente para os marcadores propostos. Os testes funcionais destas células estão em andamento.

Conclusão. Nossos estudos prévios providenciaram evidências do potencial de diferenciação das CTM-TAe para osso, cartilagem e tecido adiposo, adicionalmente, nós demonstramos que estas células foram capazes de se diferenciar em músculo e células neurais, in vitro.