**ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSO DE EQUINOS**

*(ISOLATION, EXPANSION, AND CHARACTERIZATION  OF  EQUINE  ADIPOSE-DERIVED  STEM  CELLS)*

**M.O. BRAVO1; J.M. MORAES2; C.B.S. DUMMONT1; R.R. FILGUEIRAS3; HASHIMOTO, H.H.1; R.F. GODOY[[1]](#footnote-1)\***

**RESUMO**

Devido a excelentes resultados obtidos em pesquisas com células-tronco e suas aplicabilidades promissoras, a terapia com estas células encontra-se em momento de máxima ascensão, estimulando assim, inúmeras pesquisas. A fim de padronizar o cultivo e avaliar a viabilidade de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de equinos visando a terapia celular nesta espécie, conduziu-se um estudo de isolamento, cultivo e caracterização de tais células. Para isso, foi realizada coleta de tecido adiposo de cinco equinos sem raça definida, com aproximadamente cinco anos. Em seguida, o tecido foi transportado refrigerado ao laboratório, onde foi realizado o protocolo de cultivo celular durante aproximadamente 14 dias. Após o término do cultivo celular uma alíquota de células foi encaminhada para a realização do teste de quantificação e viabilidade celular com Azul de Tripan 1%, e outra porção foi destinada à confirmação da linhagem de célula tronco mesenquimal através de imunofenotipagem com os anticorpos monoclonais anti-CD11b, anti-CD45, anti-CD90 e anti-CD105, e de diferenciação celular em linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica. Houve diferenciação celular e marcação positiva dos antígenos de superfície CD44 e MHCI e negativa dos CD45 e CD11b, confirmando-se a origem mesenquimal e não hematopoiética. A viabilidade celular média obtida das células-tronco mesenquimais foi de 92,83%, sendo satisfatória. Portanto, a utilização deste protocolo para obtenção de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo se mostrou uma opção confiável e viável.

**Palavras chave:** Células aderentes; Citometria de Fluxo; Diferenciação celular; Mesenquimais; Terapia celular.

**SUMMARY**

Due to excellent results in stem cell research and its promising applicability, the therapy with these cells is in a moment of maximum visibility and encouraging numerous studies. In order to standardize the culture and to evaluate the viability of mesenchymal stem cells from adipose tissue of horses, aiming cell therapy in this species, a study of isolation, expansion and characterisation was conducted. For this, adipose tissue was collected from five crossbred horses, around five years old. After this, the tissue was immediatly refrigerated and transported to the laboratory where was performed the isolation and culture protocol, lasting approximately 14 days. After the end of cell culture, a cell pellet was obtained and resuspended in PBS. A portion of material obtained by centrifugation was collected and the cells were stained with 1% Trypan Blue for quantification and assessment of cell viability. Another sample was collected to confirm the lineage of stem cells by flow cytometry using monoclonal against the surface markers CD11b, CD45, CD90 and CD105; and by cellular differentiation assays to chondrogenic, adipogenic and osteogenic lineages. The isolated cells differentiated in the three lineages and shown positive stainig for CD90 and CD105 and negative stainig for CD11b and CD45, confirming the isolation of stem cells from mesenchymal origin. The average cell viability obtained was 92.83% and thus satisfactory. Therefore, the use of this protocol to obtain mesenchymal stem cells from adipose tissue showed a promising option.

**Keywords**: Adherent cells; Cell differentiation; Cell therapy; Flow cytometry; Mesenchymal.

**INTRODUÇÃO**

As células-tronco (CT) possuem enorme aplicabilidade terapêutica tanto com relação à engenharia de tecidos quanto à terapia gênica (ZUK et al., 2001). As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco não hematopoiéticas e possuem propriedades multipotentes de diferenciação (GIORDANO et al., 2007; KINGHAM et al., 2007), podendo originar no organismo células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal (GIORDANO et al., 2007). Estas células podem, portanto, dar origem a linhagens de células ósseas, cartilaginosas, adiposas, musculares, hepáticas, endoteliais, epiteliais e neurogênicas (ZUK et al., 2002; PUISSANT et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005; McINTOSH et al., 2006; BROOKE et al., 2007; PERONI et al., 2008) e por isso têm sido consideradas uma fonte atrativa de regeneração tecidual (KINGHAM et al., 2007).

O interesse pelas CTM vem aumentando como tratamento eficaz para injúrias musculoesqueléticas que acontecem com certa frequência nos equinos (VIDAL et al., 2007), podendo estas serem isoladas tanto da medula óssea como do tecido adiposo. No tecido adiposo, além de maior facilidade de coleta comparado à coleta de medula óssea, pode-se encontrar cerca de 2% de CTM do total celular lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007), otimizando a colheita e expansão celular (BUNNEL et al., 2008), enquanto a medula óssea possui aproximadamente 0,001 a 0,01% de CTM do total de células (MIAO et al., 2006). Isso é interessante na terapia celular aplicada à espécie equina, principalmente porque lesões em tecidos como ossos e tendões podem requerer grandes quantidades celulares para que se alcance a eficácia terapêutica (VIDAL et al., 2007).

Critérios mínimos para a caracterização das CTMs humanas foram criados. Estas devem apresentar aderência ao plástico quando mantidas sob condições de cultura, a expressão ou não para alguns marcadores de superfície específicos e apresentar a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al. 2006). Uma grande dificuldade para a caracterização de ADSCs em medicina veterinária é a baixa disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos (CARVALHO et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais advindas do tecido adiposo de equinos que possibilite viabilidade e concentração celular satisfatórias para realização de terapia com células-tronco nesta espécie.

**MATERIAL E MÉTODOS**

A coleta de tecido adiposo foi realizada no Hospital Veterinário de Grandes Animais Universidade de Brasília (FAV/UnB), Brasília- DF, e o isolamento e cultivo das CT foram realizados no Laboratório de Reprodução e Biotecnologia Animal (FAV/UnB), baseado no protocolo preconizado por Nardi e Meirelles (2006). As CTM foram provenientes de tecido adiposo da região glútea caudodorsal paraxial (Figura 1A). Para tal, foram utilizados cinco equinos hígidos, sem raça definida, de aproximadamente cinco anos de idade. Estes foram mantidos em estação, contidos em bretes e sedados com detomidina a 0,02 mg/kg de peso vivo por via intravenosa. Foram coletados 10 g de tecido adiposo subcutâneo mediante incisão em meia lua de aproximadamente 10 cm (Figura 1B), colocado em placa de Petri estéril e pesado em balança de precisão.

O tecido coletado foi colocado em um tubo cônico de 50 mL contendo solução de transporte (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen, California, USA) e antibiótico e antimicótico (AT/AM) (Gibco, Invitrogen, California, USA)) e mantido a 8˚C., sendo imediatamente levado refrigerado ao laboratório para a sala de cultivo celular em fluxo laminar. O tecido foi lavado com tampão fosfato salina (PBS Gibco, Invitrogen, California, USA) e transferido para uma placa de petri, onde foi fracionado com auxílio de pinça anatômica e bisturi. Em seguida, o tecido foi colocado em tubo cônico de 50 mL, contendo 10 mL de tripsina 0,05% (Gibco, Invitrogen, California, USA), previamente aquecida a 37ºC, sendo mantidos na mesma temperatura em banho-maria por 30 minutos. O tecido adiposo foi transferido para outro tubo cônico de 50 mL contendo colagenase tipo I 0,3% (Gibco, Invitrogen, California, USA) na proporção de 1:3 (volume de tecido:volume de solução) e incubado em banho-maria a 37 ˚C por 30 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos de incubação. Após a digestão enzimática, os fragmentos de tecido adiposo foram distribuídos em duas garrafas de cultivo de 25cm², juntamente com 1mL de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen, California, USA) e 9 mL de colagenase tipo I 0,06%. As garrafas foram então incubadas em estufa umidificada com 5% de CO2 no ar a 37˚C, *overnight*.

**C**

No dia seguinte, o conteúdo foi transferido para tubo cônico de 50 mL e mantido sob agitação no vórtex por alguns segundos. Em seguida, as células foram filtradas com filtro de 70 µm e o restante do tecido adiposo foi descartado. O conteúdo obtido pela filtragem foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos em tubos cônico de 15 mL, sendo descartado o sobrenadante. O pellet obtido foi ressuspendido em 1mL de DMEM.

**C**

Foi colocado 500 µL da amostra em garrafa de cultivo de 25cm², juntamente com cinco mL de meio de cultivo completo (90% DMEM, 10% SFB, antibiótico e antimicótico) e incubado em estufa 5% de CO2 no ar a 37˚C. Após três dias o meio de cultivo foi trocado e com isso foram eliminadas as células não aderentes. O meio foi trocado a cada três dias até atingir a confluência de aproximadamente 75%, quando se realizou o procedimento de tripsinização da garrafa e passagem da cultura. Para isso, todo o meio antigo foi descartado, restando apenas a camada celular aderida. Foi adicionado 5 mL de tripsina 0,05% e aguardou-se de cinco a dez minutos.

Aspirou-se o conteúdo da garrafa para um tubo cônico de 50 mL contendo 4,5 mL de DMEM e 500 µL de SFB previamente aquecido em banho-maria a 37ºC, para inativação da tripsina com o SFB. O conteúdo foi centrifugado à 1500 rpm por dez minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em 1mL de DMEM e foi colocado novo meio de cultivo em garrafa de cultivo para incubar na estufa. O procedimento foi repetido sempre que a cultura atingiu a confluência.

Para haver a confirmação que as células cultivadas pertenciam a linhagem de células-tronco mesenquimais, ao final da quarta passagem foi induzida a diferenciação de uma porção celular para a linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica. Para diferenciação osteogênica, as células foram depositas em placas de seis poços e cultivadas em estufa umidificada a 37 °C e 5 % CO2 contendo 3mL de meio de diferenciação osteogênica. O meio era composto por DMEM com 15mM HEPES (Invitrogen, California, USA); 10% soro fetal bovino; 20nM de dexametasona (Alfa Aesar, Reino Unido); 10mM de β-glicerofosfato + 0,05 mM de L-ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma-Aldrich, Reino Unido); antibiótico e antimicótico. Uma porção de células destinadas para controle negativo foram cultivadas apenas com DMEM/ 15mM HEPES, 10% SFB, antibiótico e antimicótico. O meio de cultivo era trocado a cada três dias e após 21 dias de cultivo, as células foram coradas com Alizarin Red S (Alfa Aesar, Reino Unido) o qual cora a matriz mineralizada em vermelho.

Para diferenciação adipogênica, foi utilizado meio adipogênico composto por DMEM com 15mM HEPES (Invitrogen, California, USA); 10% soro fetal bovino; 1% de ITS + Premix (BD, Franklin Lakes, NJ, USA); 1µM de dexametasona Alfa Aesar, Reino Unido); 100µM de indometacina; 500µM de 3-isobutyl-1-methyl xanthina (IBMX); antibiótico e antimicótico e as células foram coradas com Oil-red O (Sigma-Aldrich, Reino Unido) o qual cora as gotículas de gordura em vermelho.

Já para diferenciação condrogênica, o meio era composto por DMEM com 15mM HEPES (Invitrogen, California, USA); 10% soro fetal bovino; 1% de ITS + Premix (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), 10ng/mL de fator de crescimento transformador beta 3 recombinnte humano (hTGFβ3); 50nM de L-ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma-Aldrich, Reino Unido); 100nM de dexametasona (Alfa Aesar, Reino Unido); 100µL de antibiótico e antimicótico e as células coradas com Alcian Blue o qual cora os proteoglicanos em azul.

Na segunda passagem, uma alíquota das células foi testada no citômetro de fluxo (FACScalibur; BD; Franklin Lakes, NJ, USA) para identificação dos principais marcadores de células tronco mesenquimais, como os anticorpos primários: mouse anti-human CD105 (Invitrogen), mouse anti-human CD90 (ABD Serotec), mouse anti-human CD45 e mouse anti-human CD11b (ABD Serotec). O anticorpo isótopo correspondente foi utilizado como controle negativo e o como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo goat anti-mouse IgG (H/L):FITC (ABD Serotec). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo (TreeStar, Ashland, USA).

Após o cultivo, o meio de cultura foi descartado e as células suspensas em PBS e acondicionadas em um *eppendorf*. Uma alíquota de 50μL da amostra foi retirada para quantificação e teste de viabilidade celular conforme Brunnel (2008), utilizando-se uma câmara de neubauer e 50 μL de Azul de Tripan1%, que atravessa a membrana celular e cora somente as células mortas.

Durante a contagem de todas as células dos quatro quadrados laterais que compõem a câmara de Neubauer, estas foram classificadas em células vivas e células mortas e, somadas, obteve-se o total de células. Para obter a porcentagem de células viáveis, dividiu-se o número de células vivas pelo número de células totais. Foi realizada a estatística descritiva dos dados obtendo-se a média, desvio padrão e a porcentagem de células viáveis.

**RESULTADOS**

Após o isolamento das células do tecido adiposo obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico, cumprindo-se assim o primeiro critério para caracterização de CTM. As células apresentaram forma semelhante a fibroblastos, típica de células-tronco.

Após a coleta, isolamento e cultivo por 14 dias das CTM do tecido adiposo dos cinco animais, foi obtido através do teste da viabilidade celular uma média de 92,83% de células viáveis. Os dados obtidos da contagem e viabilidade celular da amostra de CTM dos cinco animais estão presentes na tabela 1, sendo cada amostra correspondente a um animal diferente. Foi encontrada uma média de 3,3x109 células em 400 μL relativos à concentração celular de cada amostra dos cinco animais, tendo sido calculada após obtenção dos dados da tabela 1.

Foi confirmada a diferenciação celular nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, com a utilização dos meios indutores para cada caso. Na diferenciação osteogênica, as células formaram agregados celulares brancos semelhantes a nódulos. Após 14 (Figura 2A) e 21 dias, esses nódulos brancos e outras células adjacentes se coraram pelo Alizarin red, confirmando a diferenciação das ADSCs em células da linhagem osteogênica. Na diferenciação condrogênica, as células após 14 dias em cultura formou-se uma massa celular bem definida, porém neste momento ainda não houve marcação azulada com o Alcian Blue (Figura 2B). Com 21 dias de cultivo, a micromassa foi então corada de azul demonstrando a diferenciação das ADSCs na linhagem condrogênica. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela marcação com o Red-O. Após cultivo de 14 dias com o meio indutor adipogênico, foi observado gotículas de gordura no citoplasma das células e aos 21 dias a diferenciação em células adiposas (Figura 2C).

A citometria de fluxo foi utilizada para a identificação dos principais marcadores de células-tronco mesenquimais, sendo confirmada positivamente a marcação dos anticorpos CD105 e CD90 em todas as amostras avaliadas com média de 96,48% e 94,94% respectivamente. O contrário também foi verificado, obtendo-se marcação praticamente inexistente dos principais marcadores hematopoiéticos como CD45 e CD11b também em todas as amostras analisadas, com médias de 0,59% e 0,76%, confirmando assim a origem mesenquimal das células utilizadas para a implantação (Figura 3).

**DISCUSSÃO**

 A forma de contenção mantendo-se o animal em estação no brete, associado à sedação e anestesia local foram suficientes para a realização da coleta do tecido adiposo, não sendo necessária anestesia geral, se mostrando de acordo com a técnica descrita por Nixon et al. (2008). Desta forma, o custo e os riscos relacionados à anestesia são reduzidos.

Durante a incisão da pele e dissecção do subcutâneo para realização da coleta não foi observada manifestação de dor em nenhum dos cinco animais, sugerindo a eficácia do sedativo e da dose utilizada, associada à técnica de anestesia local. A avaliação da dor nos animais se deu por observação do comportamento e atitude durante o procedimento, no qual não foi observada nenhuma alteração, agressividade, vocalização ou mudança de expressão facial. Porém, para uma análise da dor mais adequada, outros parâmetros seriam necessários, como por exemplo, a aferição da frequência cardíaca do animal antes e durante a realização do procedimento. Contudo, mesmo a frequência cardíaca é um parâmetro subjetivo neste caso, pois pode ocorrer um aumento devido ao estresse do animal de estar no brete e ser manipulado, mesmo que não esteja com dor , como de acordo com Barreira (2005).

 O tamanho da incisão e o sítio de coleta mostraram-se adequados, sendo realizada apenas uma incisão por animal, não sendo necessária a realização de duas anestesias locais ou administração de outra dose do sedativo utilizado, ao contrário de Nixon et al. (2008) que não realizaram cultivo celular e tiveram que realizar dois sítios de coleta de tecido adiposo. Kingham et al. (2007) afirmam que cerca de 2% do lipoaspirado humano são CTM, ou seja, em 10 g de tecido adiposo, cerca de 0,2 g de CTM poderiam ser isoladas e aliado a grande capacidade de expansão das células em cultivo, faz com que seja suficiente a quantidade de tecido coletado para obter o número mínimo de células para realização de terapia celular. Além disso, Nixon et al (2008) realizaram uma incisão linear de pele, porém, a incisão em meia lua permite melhor dissecção do subcutâneo para obtenção do tecido adiposo, como verificado neste estudo.

 A antissepsia das mãos e a esterilização de todos os materiais e as soluções utilizadas para manipular o tecido e as células isoladas em laboratório mostraram-se adequadas, tendo em vista que no período de 14 dias de cultivo não ocorreu deterioração ou contaminação bacteriana dos meios de cultivo celular contidos nas garrafas de cultivo. Estas poderiam ser observadas como granularidade ao redor do núcleo, vacuolização citoplasmática ou deslocamento das células da garrafa de cultivo, como descrito por Bunnell et al. (2008). Por este mesmo motivo, podemos concluir que a solução de transporte e o método de refrigeração para o transporte do tecido ao laboratório também foram eficientes.

 Após a digestão do tecido adiposo com colagenase obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico e com formato fibrosblástico, atingindo-se o primeiro critério para caracterização de células-tronco mesenquimais (DOMINICI et al., 2006).

 Com relação à viabilidade celular, se comparado a outras fontes de CTM de equinos, este resultado foi maior que o obtido por Barreira (2005), que utilizou a separação da fração mononuclear da MO de equinos e obteve uma viabilidade de 76% de células viáveis.

Nixon et al. (2008) obtiveram uma viabilidade de 87,5% de células viáveis do tecido adiposo de equinos, porém este autor não realizou cultivo celular, apenas o isolamento de células nucleadas. Para tal, a quantidade de tecido adiposo coletado foi o dobro frente a este estudo, sendo necessários dois sítios de coleta e obtiveram células nucleadas que podem ou não ser células-tronco, o que corrobora para as vantagens do cultivo celular realizado neste trabalho, pois todas as células cultivadas e de possível utilização para terapia celular são CTM.

Se comparada a outras espécies, o resultado deste estudo também foi satisfatório, frente a viabilidade obtida em humanos após isolamento e cultivo de CTM do tecido adiposo em estudos como o de Oliveira et al. (2008) em que foi obtida uma viabilidade de 98,1% de células viáveis.

 A técnica de cultivo celular utilizada neste trabalho, bem como o procedimento de tripsinização com tripsina 0,25% durante o cultivo foram semelhantes à técnica utilizada por autores como Kingham (2007) que utilizou gordura de ratos. Também foi semelhante à técnica utilizada Zuk (2001), cujos estudos baseiam-se em tecido adiposo humano, portanto, podemos inferir que o protocolo utilizado para equinos pode ser baseado em outras espécies, já que foram obtidos resultados satisfatórios neste estudo. De acordo com Vidal et al. (2007), as CTM do tecido adiposo de equinos se expandem rapidamente em cultura em quantidades suficientes para a engenharia de tecidos, o que também foi observado neste trabalho, sendo semelhante às outras espécies mais estudadas.

 Além da grande capacidade de expansão das CTM em cultivo, relatada por Keating (2006), a quantidade média de células total obtida neste estudo foi considerada eficaz para a realização de terapia celular. Autores como Gengozian (2000), afirmam ser necessário um mínimo de cerca de 2x106 células a serem inoculadas no animal para o sucesso da terapia celular. Pode-se, portanto, inferir que a quantidade de tecido coletado foi suficiente para isolamento e cultivo das CTM, pois foi obtida uma média de 3,3x109 células em 400 μL da amostra.

ADSCs equinas na passagem 4 mostraram atividade osteogênica aos 14 dias de cultura em meio osteogênico e com aumento desta atividade aos 21 dias. A dexametasona, a vitamina C e glicerofosfato são requisitos para ADSCs se diferenciarem em osteoblastos *in vitro* (CHENG et al., 1994; DEANS; MOSELEY, 2000). De acordo com os autores citados, dexametasona promove a diferenciação e maturação de osteoblastos, aumenta a atividade de ALP, e promove a síntese de colagénio da matriz extracelular. A vitamina C promove tanto a síntese de colágeno quanto a calcificação em células em cultura. Além disso, pode alterar tanto a atividade de ALP e o glicerofosfato fornece íons de fosfato para osteoblastos, e promove a deposição de cálcio fisiológica e, portanto, é necessário para a mineralização de ADSC.

Os efeitos da dexametasona, um indutor da osteogênese e diferenciação adipogênica, dependem da dosagem e do tempo. A uma concentração baixa, leva a diferenciação em osteoblastos, enquanto à uma concentração elevada, desencadeia a interacção do reccptor glucocorticóide com a insulina. Em seguida, as células se diferenciam em adipócitos (STEVEN et al., 2007). Neste estudo, a hipótese de que ADSCs de equinos podem se diferenciar em adipócitos foi verificada pela coloração Oil Red à partir de 14 dias de cultura. Após 21 dias, as gotículas de gordura apresentavam-se maiores em tamanho e em quantidade, assim como observado por Ladak (2011).

A diferenciação condrogênica induzida e cultura de ADSCs têm sido extensivamente pesquisada (NESIC et al., 2006) . Neste estudo foi utilizada a cultura em micromassa, sendo bem sucedida na indução da diferenciação condrogênica à partir de 21 dias de cultura em meio condrogênico.

CTMs derivadas de tecido adiposo devem apresentar marcação positiva para os seguintes antígenos de superfície: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49 (d), CD49 (e), CD54 e CD55, CD59, CD73, CD90 e CD105 e CD106 e CD146 e CD165 (SCHÄFFLER; BUCHLER, 2007). Os marcadores de superfície CD11b, CD18, CD50, CD56, CD62 não estão presentes na superfície da célula ADSCs. Tais células também não expressam os marcadores hematopoiéticas CD14, CD31, ou CD45. As células ADSCs são positivas para a classe I da proteína de histocompatibilidade, HLA-ABC e negativas para a proteína da classe II, HLA-DR (GIMBLE; GUILAK, 2003). Em nosso estudo, confirmamos a existências dos marcadores CD90 e CD105 e a baixíssima ocorrência dos marcadores CD11b e CD45, caracterizando nossas células como células-tronco de origem mesenquimal. Os valores quase inexistentes dos principais marcadores hematopoiéticos que confirmaram a origem mesenquimal das células utilizadas para a implantação foram bem diferentes dos encontrados por Ladak (2011), podendo demonstrar maior reminiscência de células como macrófagos, fibroblastos e endoteliais que também expressam marcadores hematopoéticos no cultivo de células tronco mesenquimais no trabalho deste autor que utilizou ratos como modelos experimentais.

O protocolo utilizado neste trabalho, para isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais advindas do tecido adiposo de equinos foi eficiente tendo em vista a celularidade e viabilidade obtidas, sendo estas satisfatórias para realização da terapia celular na espécie estudada. Após realização do protocolo, observou-se que número de células em suspensão que poderiam ser inoculadas no animal para o tratamento de diversas afecções, principalmente de origens ligamentares e tendíneas, foi maior que o mínimo considerado em literatura para o sucesso da terapia com células-tronco.

A terapia com células-tronco na medicina veterinária vem recebendo cada vez mais destaque em pesquisas de instituições de ensino e laboratórios. Apesar da fonte mais acessível de CTA no momento ser a FCM advindas da MO, as CTM advindas de diversos tecidos vem ganhando espaço nas pesquisas e são consideradas opções terapêuticas promissoras em virtude de suas características. Porém ainda faltam estudos sobre os métodos de expansão em cultura e marcadores específicos para o acompanhamento de células-tronco, visando avaliar o sucesso da terapia. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos em diversos estudos, incluindo o presente trabalho, mais pesquisas são necessárias utilizando-se a espécie equina para a padronização do isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais advindas do tecido adiposo de equinos visando otimizar o tempo entre a coleta e a realização da terapia celular.

Neste estudo, uma monocamada de células semelhantes a fibroblastos e aderentes ao plástico foi desenvolvida após a digestão do tecido adiposo pela colagenase. As células isoladas foram examinados em termos de seu potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Além disso, à análise citofluorométrica dos marcadores superfície dessas células identificou-se células positivas para CD90 e CD105 de células negativas para CD45 e CD11b. Atingiu-se os três critérios que são propostos para se identificar células-tronco mesenquimais (DOMINICI et al., 2006). Posto isso, as células isoladas com este protocolo, a partir de tecido adiposo de equinos podem ser considerados como as células-tronco mesenquimais.

**AGRADECIMENTOS**

Ao CnPQ e à FAPDF pelo auxílio pesquisa concedido para o desenvolvimento do projeto.

Ao DPP/UnB pela bolsa de iniciação científica cedida à autora do artigo.

À professora Carolina Lucci e Laboratório de Reprodução e Biotecnologia Animal (FAV/UnB) pelas instalações cedidas ao processamento das amostras.

À SEAPA/DF por conceder os animais utilizados no projeto.

Ao Hospital Veterinário de Grandes Animais da Universidade de Brasília por permitir a utilização das instalações para realização das coletas do tecido adiposo e internação dos animais.

**REFERÊCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AQUINO, J. B.; HJERLING-LEFFLER, J.; KOLTZENBURG, M.; EDLUND, T.; VILLAR, M. J.; ERNFORS, P. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. **Experimental Neurology**, v.198, n.2, p.438–449, 2006.

BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.18, n.1, p.846-858, 2007.

BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cell: Isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v. 45, n. 2, p. 115-120, 2008.

CARVALHO, A.M. et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.132, n.2-4, p. 303-306, 2009.

CHENG, S.L.; YANG, J.W.; RIFAS, L.; ZHANG, S.F.; AVIOLI, L.V. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **The Endocrine Society***,* v. 134, n.1, p. 227-236, 1994.

COLOMÉ, L. M. **Avaliação de envolvimento de células-tronco autólogas de medula óssea em associação com técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, 2007.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology,** v.28, n.8, p. 875-884, 2000.

DOMINICI, M.; LeBLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

FORTIER, L. A. Stem cells: classifications, controversies and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 5, p. 415-423, 2005.

GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hematopoietic progenitors. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN, N. C. (Eds.) **Schalm’s veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p. 91-96.

GIMBLE, J.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy,** v. 5, n.5, p. 362-369, 2003.

GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. From the laboratory bench to the patient’s bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, n.1, p.27–35, 2007.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M. et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 189**,** n.1, p 54-63, 2001.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p.393-395, 2005.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. **Current Opinion in Hematology**, v.13, n.6, p.419–425, 2006.

KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENGHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v.207, n.2, p.267–274, 2007.

LADAK, A; OLSON, J.; TREDGET, E. E.; GORDON, T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. **Experimental Neurology** v.228, n. 2, p.242–252, 2011.

McINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J. B.; FLOYDE, Z. E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J. P.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells – Tissue Specific Stem Cells,** v.24, n.6, p.1246-1253, 2006.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v.30, n.3, p.681-687, 2006.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**, v.174, n. 6, p.249–282, 2006.

NESIC, D.; WHITESIDE, R.; BRITTBERG, M.; WENDT, D.; MARTIN, I.; MAINIL-VARLE, P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 58, n. 2, 300-322, 2006.

NIE, X.; ZHANG, Y.-J.; TIAN, W.-D.; JIANG, M.; DONG, R.; CHEN, J.-W.; JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue–engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Maxillofacial. Surgery**, v.36, n.1, p. 32–38, 2007.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, p.928–937, 2008.

OLIVEIRA, B. J. N. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia , 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, 2007.

PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIE, M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental Cell Research**, v.314, n.2, p.603-615, 2008.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, v.129, n.1, p.118–129, 2005.

RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E.Z.Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie,** v.87, n.8, p. 125–128, 2005.

SCHAFFLER, A.; BUCHLER, B. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells,** v. 25, n. 4, p. 818-827, 2007.

[VIDAL, M. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Vidal%20MA%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus).; [KILROY, G. E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Kilroy%20GE%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus).; [LOPEZ, M. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Lopez%20MJ%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus).; [JOHNSON, J. R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Johnson%20JR%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus).; [MOORE, R. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Moore%20RM%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus).; [GIMBLE, J. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Gimble%20JM%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus). 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, n.7, p.613-622, 2007.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais**... São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004. p. 23.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células tronco: Origens e propriedades. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. (Org.) **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p.109-113.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, 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.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, H.I.; MIZUNO, H.; AFONSO, 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, n.2, p.4279–4295, 2002.



**B**

Figura 1. Coleta do tecido adiposo. A) Antissepsia da região da coleta. B) Dissecção do tecido subcutâneo e separação do tecido adiposo.

**B**

**A**

Tabela 1 .Contagem do total de células (TC), das células vivas (CV) e células mortas (CM) das amostras dos cinco animais para realização do teste de viabilidade expresso em porcentagem de células viáveis (V). Brasília, DF, 2010.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Animal | TC | CV | CM | V (%) |
| 1 | 817 | 734 | 83 | 89,84 |
| 2 | 890 | 837 | 53 | 94,04 |
| 3 | 1665 | 1545 | 120 | 92,79 |
| 4 | 2416 | 2368 | 48 | 98,01 |
| 5 | 3658 | 3272 | 386 | 89,45 |
| DP | 1889,2±1183,686 | 1751,2±1073,109 | 138±141,5786 | 92,83±3,489903 |
|  |  |  |  |  |

 – média; AM – amostra; DP = desvio padrão

****

C

B

A

Figura 2. Confirmação da diferenciação celular de ADSC em linhagem osteogênica aos 14 dias, coloração Alizarin Red (A), condrogênica aos 14 dias, formação de agregado celular nodular (B) e adipogênica aos 21 dias, coloração Oil Red (C). Brasília, DF, 2010.

****

A

B

C

D

E

**F**

Figura 3. Análise dos marcadores de células-tronco de tecido adiposo, de um dos equinos do experimento, por citometria de fluxo. A: anticorpo anti-CD105; B: anticorpo anti-CD45; C: anticorpo anti-CD11b; D: anticorpo anti-CD90; E: *dot plot* das células-tronco equinos; F: representação 3D da população de células-tronco de equinos. Linha azul: leitura do anticorpo testado; Linha vermelha tracejada: Controle isótipo negativo. Brasília, DF, 2010.

1. Hospital Veterinário de Grandes Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), Galpão 04, Granja do Torto, Brasília, DF, 70636-200, Brasil. \*Autor para correspondência: robertagodoy@unb.br

2 Universidade Federal de Goiás.

3 Hospital Veterinário Clemenceau. [↑](#footnote-ref-1)