

**Revista Ars Veterinaria** - Permite-se a reprodução total ou parcial dos trabalhos, desde que seja indicada explicitamente a fonte de referência.

**Revista Ars Veterinaria** - It allows the total or partial reproduction of the work, provided the source reference is explicitly indicated.

Fonte: <http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/about/submissions#copyrightNotice>

# ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSE DE EQUINOS

## ISOLATION, EXPANSION, AND CHARACTERIZATION OF EQUINE ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS

M. O. BRAVO<sup>1</sup>; J. M. MORAES<sup>2</sup>; C. B. S. DUMMONT<sup>1</sup>; R. R. FILGUEIRAS<sup>3</sup>;  
H. H. HASHIMOTO<sup>1</sup>; R. F. GODOY<sup>1\*</sup>

### RESUMO

Devido aos 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 tal, foi realizada coleta de tecido adiposo de cinco equinos sem raça definida, com aproximadamente cinco anos. Em seguida, o tecido foi refrigerado e transportado ao laboratório, onde foi realizado o protocolo de cultivo celular durante aproximadamente 14 dias. Após o término deste procedimento, uma alíquota de células foi encaminhada para a realização do teste de quantificação e viabilidade celular com Azul de Tripán 1%, sendo outra porção destinada à confirmação da linhagem de célula tronco mesenquimal por meio 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 MHC I 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% considerada satisfatória. Portanto, a utilização deste protocolo para obtenção de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo se mostrou uma opção confiável e viável para utilização na terapia celular em equinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células aderentes. Citometria de Fluxo. Diferenciação celular. Mesenquimais. Terapia celular.

### SUMMARY

Due to the excellent results of stem cell research and its promising applicability, the therapy with these cells is undergoing a period of maximum visibility and numerous studies. In order to standardize the culture and to evaluate the viability of mesenchymal stem cells from adipose tissue of horses, aiming at cell therapy in this species, a study of isolation, expansion and characterization was conducted. For this, adipose tissue was collected from five crossbred horses aged approximately five years old. Subsequently, the tissue was immediately refrigerated and transported to the laboratory where the isolation and culture protocol, lasting approximately 14 days, was performed. After the end of this procedure, 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 showed positive staining for CD90 and CD105 and negative staining for CD11b and CD45, confirming the isolation of stem cells of 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 was deemed to be a promising option for cell therapy in horses.

**KEY-WORDS:** Adherent cells. Cell differentiation. Cell therapy. Flow cytometry. Mesenchymal.

<sup>1</sup> Universidade de Brasília (UnB), Galpão 04, Granja do Torto, Brasília, DF, 70636-200, Brasil. \*Corresponding author: [robertagodoy@unb.br](mailto:robertagodoy@unb.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás. Rodovia Goiânia/Nova Veneza (GO 462), km 0 Caixa Postal 131- CEP: 74001-970 Goiânia - GO

<sup>3</sup> Hospital Veterinário Clemenceau. SAIS s/n It 14 CEP: 70610-000, Brasília - DF - Brasil

## INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) possuem diversas aplicabilidades terapêuticas 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 (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 músculo-esqueléticas que acontecem com certa frequência nos equinos (VIDAL et al., 2007), sendo que estas podem ser isoladas tanto da medula óssea como do tecido adiposo. No tecido adiposo, além de maior facilidade de coleta comparado a medula óssea, pode-se encontrar cerca de 2% de CTM do total celular lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007), otimizando a colheita e a 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 requerer grandes quantidades celulares para alcançar a eficácia terapêutica (VIDAL et al., 2007).

Após a digestão do tecido adiposo com collagenase obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico e com formato fibroblástico, atingindo-se o primeiro critério para caracterização de células-tronco mesenquimais, considerados por Dominici et al., 2006 e outros autores, que realizaram pesquisas em equinos (CARVALHO, 2009) e cães (VIDAL, 2007).

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 & MEIRELLES (2006). As CTM foram provenientes de tecido adiposo da região glútea caudodorsal paraxial (Figura 1A). Foram utilizados cinco equinos hígdos de aproximadamente cinco anos de idade e sem raça definida.

Estes foram mantidos em estação, contidos em bretes e sedados com detomidina a 0,02 mg/kg de peso vivo por via intravenosa. Em seguida, foi realizada tricotomia de uma área de aproximadamente 10 x 10 cm na região glútea caudodorsal paraxial. Foi realizada uma anestesia local em “L” invertido com lidocaína 2% e a avaliação da dor nos animais foi feita mediante observação do comportamento do animal em relação ao estímulo doloroso. Uma incisão em meia lua de aproximadamente 10 cm foi feita aproximadamente 10 cm abaxial e 10 cm lateral à base da cauda e dissecação do tecido subcutâneo, separação e coleta de 10g do tecido adiposo. (Figura 1B). A amostra obtida foi depositada em placa de Petri estéril para pesagem em balança de precisão.

A incisão de pele, não foi suturada em virtude do espaço morto irreduzível deixado após a coleta do tecido, o que poderia predispor uma contaminação. Realizou-se, portanto, curativo diário com iodopovidona 0,1 % até completa cicatrização por segunda intenção.

Após este procedimento, o tecido coletado foi colocado em um tubo cônico de 50 mL contendo solução de transporte DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Gibco, Invitrogen, California, USA) antibiótico e antimicótico (AT/AM) (Gibco, Invitrogen, California, USA) mantido a 8°C, sendo imediatamente refrigerado e transportado ao Laboratório para a sala de cultivo celular em fluxo laminar. Nesta etapa a amostra foi lavada com tampão fosfato salina (PBS Gibco, Invitrogen, California, USA) e transferida para uma placa de petri, onde foi fracionada 40 porções com auxílio de pinça anatômica e bisturi. Em seguida, acondicionou-se em tubo cônico de 50 mL, contendo 10 mL de tripsina 0,05% (Gibco, Invitrogen, California, USA), previamente aquecida a 37°C, sendo mantidos na mesma temperatura em banho-maria por 30 minutos. Após este procedimento, o tecido adiposo foi transferido para outro tubo cônico de 50 mL contendo collagenase 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 25cm<sup>2</sup>, juntamente com 1mL de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen, California, USA) e 9 mL de collagenase tipo I 0,06%. As garrafas foram então incubadas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico a 37°C, *overnight*. Após 18 horas 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 utilizando-se 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 ressuscitado em 1mL de DMEM. Foi colocado 500 µL da amostra em garrafa de cultivo de 25cm<sup>2</sup>, juntamente com cinco mL de meio de cultivo completo (90% DMEM, 10% SFB, antibiótico e antimicótico) e incubado em estufa 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico 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 37°C, para inativação da tripsina com o SFB. O conteúdo foi centrifugado à 1500 rpm por dez minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado 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 depositadas em placas de seis poços e cultivadas em estufa umidificada a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> contendo 3 mL 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 xantina (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.

Para diferenciação condrogênica, o meio foi composto por DMEM contendo 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 recombinante 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 *ependorf*. 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 Tripán 1%, que atravessa a membrana celular e cora somente as células mortas.

A contagem celular foi realizada em todas as células dos quatro quadrados laterais que compõem a câmara de Neubauer, sendo que as células foram classificadas em vivas e mortas. O total de células foi obtido somando-se o resultado obtido. Para obter a porcentagem de células viáveis, dividiu-se o número de células vivas pelo número de células totais. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo feita a estatística descritiva dos dados.

## RESULTADOS

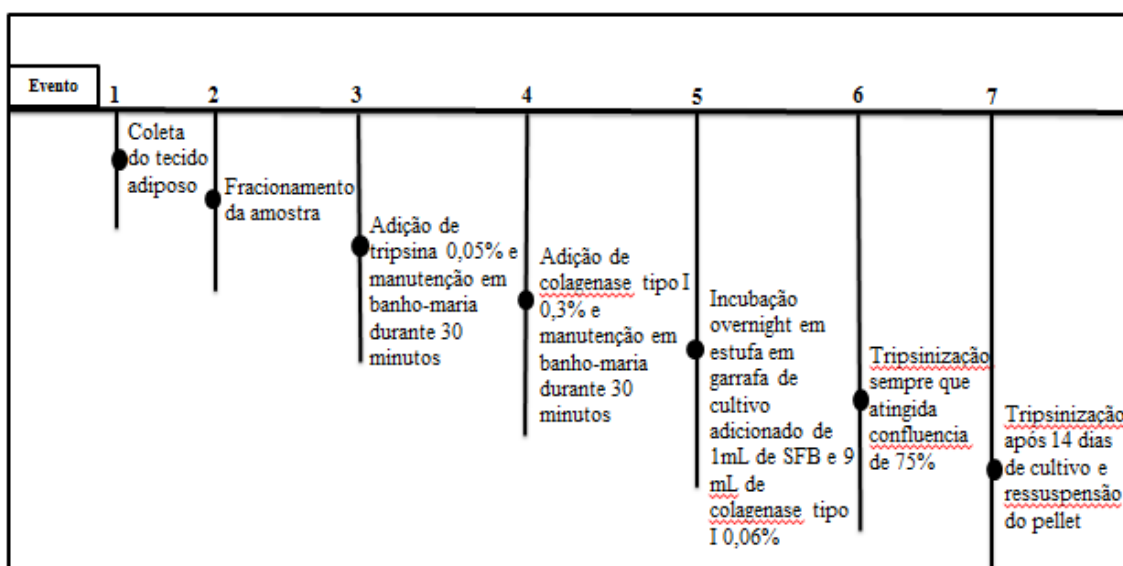
Após o isolamento das células do tecido adiposo obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico, cumprindo-se assim o primeiro critério para caracterização de CTM. As células apresentaram forma semelhante a fibroblastos, típica de células-tronco.

Após a coleta, isolamento e cultivo por 14 dias (Figura 2) 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 na 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  $3,3 \times 10^9$  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 3A) e 21 dias, esses nódulos brancos e



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



**Figura 2** - Sequência do protocolo de cultivo de 14 dias das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. Brasília, DF, 2010.

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, formaram uma massa celular bem definida, porém neste momento ainda não houve marcação azulada com o Alcian Blue (Figura 3B). 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 houve a diferenciação em células adiposas (Figura 3C).

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 4).

## 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 foi necessária anestesia geral, pois, durante a incisão da pele e dissecação do subcutâneo para realização da coleta não foi observada manifestação de dor em nenhum dos cinco animais se mostrando de acordo com a técnica anestésica descrita por Nixon et al. (2008), apesar da técnica cirúrgica não ter sido a mesma realizada neste estudo. Desta forma, o custo e os riscos relacionados à anestesia são reduzidos. 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. No entanto, neste caso a frequência cardíaca torna-se um parâmetro subjetivo, pelo fato de ocorrer alterações em sua aferição, devido ao estresse em que o animal é submetido ao entrar no brete e ao ser manipulado, o que segundo Barreira (2005), dificulta sua utilização como método de avaliação.

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 anestésias 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. No entanto o trabalho deste autor utilizou 20g de tecido adiposo, o dobro utilizado neste estudo, o que justifica a necessidade de um segundo sítio de coleta. Porém,

não pode ser afirmado que o aumento da quantidade de tecido adiposo utilizado corrobora com o aumento da eficácia do processo quando não é realizado o cultivo celular, pois não se sabe ao certo qual a porcentagem de células-tronco mesenquimais da amostra.

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, foi verificado neste estudo, que a incisão em meia lua, permite melhor dissecação do subcutâneo para obtenção do tecido adiposo.

A antisepsia 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 collagenase obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico e com formato fibroblástico, atingindo-se o primeiro critério para caracterização de células-tronco mesenquimais, considerados por Dominici et al., 2006 e outros autores, que realizaram pesquisas em equinos (CARVALHO, 2009) e cães (VIDAL, 2007).

Com relação à viabilidade celular, se comparado a outras fontes de CTM de equinos, este resultado obteve médias acima de 90% de células viáveis, sendo maior que o obtido por Barreira (2005), que utilizou a separação da fração mononuclear da medula óssea 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. Ainda, os autores 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.

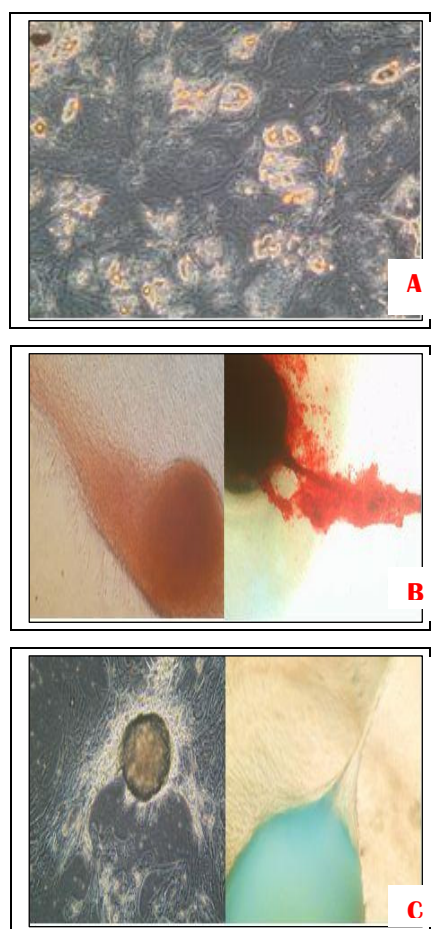
Se comparada a outras espécies, o resultado deste estudo também foi satisfatório. A viabilidade celular obtida em humanos após isolamento e cultivo de CTM do tecido adiposo foi 98,1% de células viáveis (OLIVEIRA et al., 2007).

A técnica de cultivo celular utilizada neste trabalho, bem como o procedimento de tripsinização com

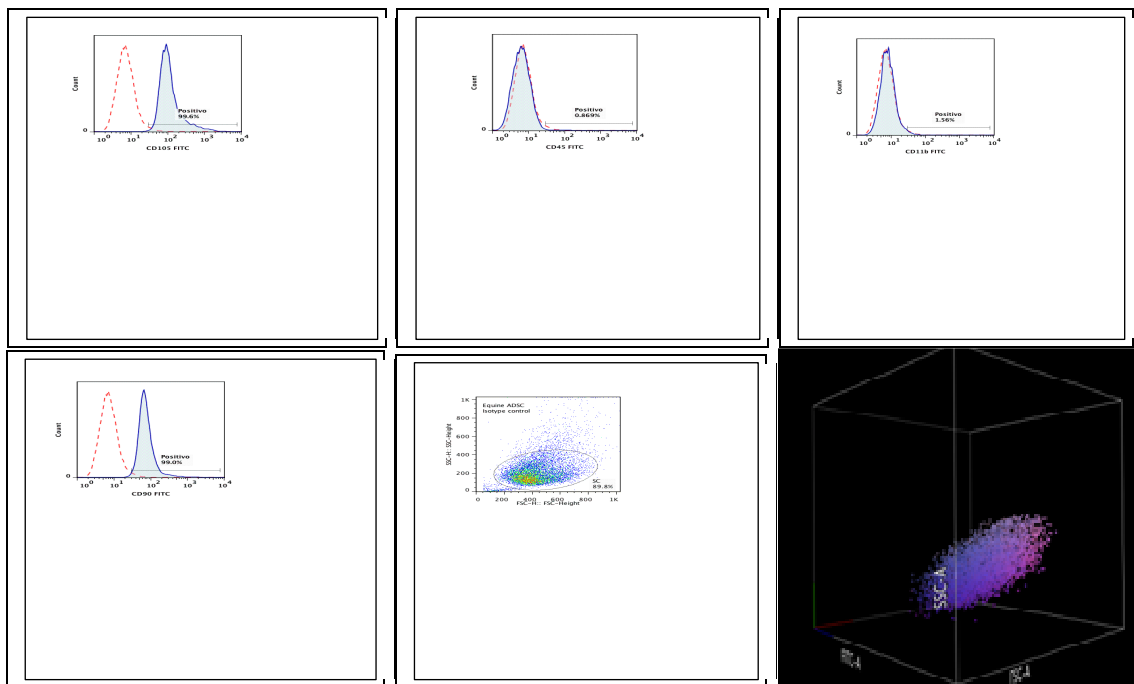
**Tabela 1** - Dados obtidos na contagem do total de células (TC), contagem das células vivas (CV) e contagem de células mortas (CM). das amostras de CTM dos cinco animais durante realização do teste de viabilidade expresso em porcentagem de células viáveis (V). Brasília, DF, 2010.

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
	1889,2	1751,2	138	92,83
DP	±1183,686	±1073,109	±141,5786	±3,489903

– média; AM – amostra; DP = desvio padrão



**Figura 3** - 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.



**Figura 4** - 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.

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 et al. (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 totais obtida neste estudo foi considerada eficaz para a realização de terapia celular. Autores como Gengozian (2000), afirmam ser necessário um mínimo de cerca de  $2 \times 10^6$  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  $3,3 \times 10^9$  células em 400  $\mu$ L da amostra.

ADSCs equinas na passagem 4 mostraram atividade osteogênica aos 14 dias de cultura em meio osteogênico e 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 colagênio da matriz extracelular. A vitamina C, promove tanto a síntese de colágeno quanto a calcificação em cultura celular e altera também a atividade de ALP e o glicerofosfato, fornece íons de fosfato para osteoblastos, 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 interação do receptor glucocorticóide com a insulina. Em seguida, as células se diferenciam em adipócitos (HOYNOWSKI 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 hematopoiéticos 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, o que confirma 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 hematopoiéticos 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 o 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 células-tronco adultas no momento ser a fração de células mononucleares advindas da medula óssea, 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 examinadas 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, o que confirmou a origem mesenquimal das células. Portanto, 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 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Edital N° 17/2008) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF – Edital N.º 05/2008) pelo apoio financeiro cedido ao projeto.

À prof. Dra. Carolina Madeira Lucci (Instituto de Ciências Biológicas /UnB) pelo apoio e espaço concedido à execução do cultivo celular.

À Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Distrito Federal (SEAPA-DF) pela cessão dos animais utilizados no projeto.

Ao Hospital Veterinário de Grandes Animais da Universidade de Brasília (UnB), por permitir a utilização das instalações para realização das colheitas de tecido adiposo, procedimentos cirúrgicos e internação dos animais.

## REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. M.; LEMING, M. T.; TUCKER, J. R.; BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K. E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cell. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.362, n.2, p.347-353, 2007.

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.; TERENCE, 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.

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, p.300-322, 2006.

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. **Exerto 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.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, n.7, p.613-622, 2007.

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.