



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

Tácito Emanuel Ferreira Damasceno

**ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE OVINOS CRIADOS
NA REGIÃO SEMIÁRIDA DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO.**

Petrolina-PE

2015

Tácito Emanuel Ferreira Damasceno

**ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE OVINOS CRIADOS
NA REGIÃO SEMIÁRIDA DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO.**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, *Campus* de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santana de Lima

Petrolina-PE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
NO SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tácito Emanuel Ferreira Damasceno

ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE OVINOS CRIADOS
NA REGIÃO SEMIÁRIDA DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Veterinárias, pela Universidade Federal do
Vale do São Francisco.

Aprovada em: 30 de dezembro de 2015.

Banca Examinadora



Dr. Ricardo Santana de Lima, Universidade Federal do Vale do São Francisco



Dra. Milena Botelho Pereira Soares, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação
Oswaldo Cruz/Bahia



Dra. Maria Helena Tavares de Matos, Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Neuzete e José, principais
incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Quando entregamos nossos desejos em preces a Deus, nunca devemos perder a fé de que elas serão atendidas. Agradeço, em primeiro lugar, a Ele por sempre tranquilizar-me nos momentos mais difíceis e por tornar a concretização deste trabalho possível.

Agradeço profundamente a toda minha família, por vibrar junto comigo em cada vitória, pelo apoio e incentivo, pelas palavras de conforto e, principalmente, por propiciar um ambiente familiar tão especial. Aos meus pais, irmãs, avós, tios e primos, todo meu carinho e gratidão.

Se não houvesse alguém disposto a acreditar em meu potencial e no meu trabalho, teria sido muito difícil criar e executar este trabalho. Muito obrigado ao Professor Dr. Ricardo Santana de Lima, meu orientador, por ter sido compreensivo, amigo, pelo suporte em todas as etapas do trabalho, e pela confiança em mim depositada. Tudo isso contribuiu positivamente para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Dra. Milena Botelho Pereira Soares, por ter proporcionado a minha ida ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), fornecendo suporte essencial para a execução do meu trabalho.

Agradeço profundamente ao doutorando, Cássio Santana Meira, pela receptividade, amizade, por todo apoio na execução deste trabalho, pelos momentos de aprendizado e pela paciência.

A todos da família LETI por permitirem que eu me sentisse em casa, muito obrigado pelos momentos de aprendizagem compartilhados, pela amizade e pelo riso solto que rolava nos momentos do lanche. Agradeço, especialmente, à Cássio, D. Vera, Dr. Diogo, Tati, Carol, Rosanne e Edileusa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido (CPGCVS) e a todos os professores, por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem para o crescimento dos seus alunos. E aos que, direta ou indiretamente, incentivaram-me e contribuíram para a busca de conhecimento e melhor execução deste trabalho, como a Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos, Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior e a Profa. Dra. Jane Eyre Gabriel.

Agradeço aos colegas da turma 2013.2 do CPGCVS, pelo apoio, torcida e amizade.

Talvez eu não tivesse chegado até aqui, se não fosse pelo grande incentivo de minha querida amiga Luciana da Paz, a ela meu agradecimento especial.

Agradeço a Simone e Nayara, por contribuírem para que eu conciliasse os estudos e o trabalho, de forma que nenhum fosse prejudicado no final.

Aos amigos que foram como irmãos e não mediram esforços em fornecer suporte em Petrolina e Salvador, Adriana, Aline, Aninha, James, Jamille, Layse, Thaís e Wadson, a vocês minha eterna amizade e gratidão.

A todos os meus amigos, obrigado pelas conversas, incentivo e pelos momentos de distração, eles foram essenciais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos vocês, meu muito obrigado!!!

EPÍGRAFE

“Ninguém ignora, e nem sabe tudo.
Sabemos alguma coisa, ou ignoramos
alguma coisa. Por isso aprendemos
sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

A maioria dos tecidos adultos tem reservas de células-tronco, que atuam na manutenção da integridade, reparo de tecidos lesados e na remodelação de órgãos. É possível isolar essas células *in vitro*, induzir seu cultivo e sua proliferação. Este trabalho buscou estabelecer um protocolo de isolamento, cultivo e caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo de ovinos criados na região de Petrolina. A coleta de amostras foi realizada em 10 animais, durante o fluxo de abate no Abatedouro Municipal de Petrolina, dos quais foram coletadas amostras fragmentares de tecido adiposo subcutâneo. As amostras foram processadas no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia-LETI do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPqGM-FIOCRUZ/BA. As células obtidas foram isoladas, cultivadas e caracterizadas quanto a sua morfologia, através de avaliação citoquímica e análise por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Avaliou-se também a capacidade de proliferação das células através da incorporação da ^3H -timidina. Puderam-se obter células-tronco mesenquimais e estas expressaram características morfológicas fibroblastóides, aderência ao plástico em cultura monocamada confluyente após a primeira semana de cultivo. Além disso, células em 5ª passagem demonstraram potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogênica e adipogênica após indução em meios de cultura específicos. As células avaliadas neste estudo apresentaram propriedades mesenquimais e alta taxa de proliferação.

Palavras-chaves: células-tronco, ovino, diferenciação, terapia celular.

ABSTRACT

Most adult tissues have stem cells reserves, which act in integrity maintenance, injured tissue repair and organs remodeling. It is possible to isolate those in vitro cells, induce their cultivation and proliferation. This paper sought to establish an isolation protocol, cultivation and morphological characterization of mesenchymal stem cells extracted from adipose tissue of sheep raised in Petrolina region. The sampling was performed in ten animals during slaughtering flow at Petrolina Municipal Slaughterhouse, from which were collected subcutaneous adipose tissue fragmentary samples. The samples were processed in the Engineering Tissue and Immunopharmacology Laboratory at the Research Center Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA. The obtained cells were isolated, cultivated and characterized by its morphology through cytochemical evaluation and optical and scanning electron microscopy. It was also evaluated the ability of cells proliferation by the ^3H -thymidine incorporation. There could be obtained mesenchymal stem cells and those expressed fibroblast morphology and adherence to plastic in monolayer culture confluence after the first week of culture. Moreover, 5th passage cells demonstrated potential of osteogenic and adipogenic cell lines differentiation after induction in specific culture media. The cells evaluated in this paper showed mesenchymal properties and high proliferation rate.

Keywords: Stem cell, sheep, differentiation, cell therapy,

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 – Tipos de células-tronco. Adaptado de Whitworth e Banks (2014).	19
Figura 2 - Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.	32
Figura 3 - CTMs provenientes de tecido adiposo ovino visualizadas por microscopia óptica. (A) Cultura primária de células com morfologia pouco definida e presença de estruturas não aderidas (seta vermelha) após 3 dias de cultivo. (B) Células em 3ª passagem após 15 dias de cultivo, no aumento de 100X. (C) Células aderentes (aumento de 200X) com morfologia fibroblastóide (seta preta).	39
Figura 4 - Tubos com células extraídas do tecido adiposo após centrifugação. <i>Pellet</i> formado por células isoladas no fundo dos tubos, indicado pela seta preta.	40
Figura 5 - Crescimento celular em monocamada aderente ao plástico visualizado por microscopia óptica. (A e B) Morfologia fibroblastóide (setas brancas) celular estável atingindo confluência total no aumento de 400X.	41
Figura 6 - Morfologia de CTMs isoladas do tecido adiposo ovino visualizadas por microscopia óptica. (A) Cultura de CTMs esparsas com morfologia fibroblastóide (seta), (B) células apresentando semi-confluência. (C e D) CTMs com bastante proliferação celular.	42
Figura 7 - Características morfológicas de CTMs coradas em Panótico Rápido visualizadas por microscopia óptica. Células aderentes com formato fusiforme(seta preta). Células confluentes (seta vermelha) núcleos grandes, íntegros e centralizados (contorno tracejado vermelho). (A) 100X, (B) 200X, (C) 400X e (D) 1000X.	44

- Figura 8 - Micrografia eletrônica de varredura de CTMs isoladas do tecido adiposo.** Células fibroblastóides com estabilização da morfologia celular apresentando projeções citoplasmáticas. 45
- Figura 9 - Micrografia eletrônica de varredura de CTMs isoladas do tecido adiposo.** Célula-tronco mesenquimal evidenciando a morfologia fibroblastóide e os detalhes dos prolongamentos citoplasmáticos de tamanhos variados. 46
- Figura 10 – Gráfico demonstrativo da taxa de incorporação de ³H-timidina pelas CTMs.** As CTMs foram cultivadas em meio DMEM com ³H-timidina e incubadas durante tempos diferentes. Pode-se visualizar a taxa de proliferação nos respectivos tempos de incubação (48, 72 e 96 horas) pela quantidade de ³H-timidina incorporada ao DNA celular (***) = p<0,05). 47
- Figura 11 - Diferenciação osteogênica de CTM derivadas do tecido adiposo de ovino visualizada por microscopia óptica.** (A) Células indiferenciadas no grupo controle cultivadas em meio DMEM. (B, C, D, E e F) Células diferenciadas cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica e coradas com Alizarin Red, evidenciando a mineralização da matriz extracelular (A, B, C e D em aumento de 200X / E e F em aumento de 400X). 49
- Figura 12 - Diferenciação adipogênica de CTM derivadas do tecido adiposo de ovino visualizada por microscopia confocal.** (A) Grupo Controle com células indiferenciadas cultivadas em meio DMEM. (B,C e D) Células diferenciadas cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e coradas pelo Oil Red, que evidencia as gotículas lipídicas intracelulares (setas pretas) em aumento de 200X. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO ₂	Gás carbônico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CPM	Contagem por minuto
CT	Células-tronco
CTA	Células-tronco adulta
CTE	Células-tronco embrionária
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DMEM	<i>Dulbeco's Modified Eagle Medium</i> (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kV	quilovolt
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> (Células-tronco mesenquimais)
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	potencial Hidrogeniônico
SFB	Soro fetal bovino
SPRD	Sem padrão racial definido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Ovinocultura no Submédio São Francisco	17
2.2. Células-tronco	17
2.3. Células-tronco mesenquimais	20
2.4. Tecido adiposo	22
2.5. Cultivo celular	24
2.6. Proliferação e diferenciação celular	25
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo geral	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1. Considerações éticas	30
5.2. Local de execução e amostra experimental	30
5.3. Coleta e remessa ao laboratório	30
5.4. Isolamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo	31
5.5. Cultivo de células-tronco derivadas do tecido adiposo	33
5.6. Viabilidade celular	33
5.7. Expansão de CTMs derivadas de tecido adiposo	34
5.8. Análise citoquímica de CTMs – Panótico Rápido	34
5.9. Processamento de CTMs – Microscopia eletrônica de varredura	35
5.10. Criopreservação de linhagem de CTMs	35
5.11. Descongelamento de CTMs	36
5.12. Ensaio de proliferação celular	36
5.13. Ensaio de diferenciação adipogênica	37
5.14. Ensaio de diferenciação osteogênica	37
5.15. Análise estatística	38
6. RESULTADOS	39
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÕES	56
9. PERSPECTIVAS	56

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos tecidos adultos possuem reservas de células que atuam na manutenção da integridade, no reparo e na remodelação de tecidos e órgãos lesados (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005). Essas células são denominadas células-tronco (CT), possuem capacidade intrínseca de auto-regeneração e diferenciação em tipos celulares especializados (BAKSH et al., 2004).

Inicialmente isoladas em tecidos embrionários, as células-tronco podem também ser encontradas em tecidos diferenciados, quando são denominadas células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs são um tipo de células-tronco adultas e são capazes de originar células diferenciadas de acordo com o tecido no qual elas estão inseridas (BRUCE et al., 2011).

Além do perfil morfológico e da expressão de antígenos de superfície, considera-se como critério básico para a caracterização de célula-tronco mesenquimal, a sua capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (PITTENGER et al., 1999). Por isso, as CT fornecem perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular (MONTEIRO et al., 2010).

Assim, centros de pesquisas têm testado o comportamento destas células em diferentes protocolos, com o objetivo de encontrar padrões e subsidiar o uso dessas estratégias em biotecnologia e terapia celular nas medicinas humana e veterinária, em especial em processos de lesão crônica e regeneração tecidual nas áreas de cardiologia, neurologia, ortopedia e endocrinologia (AMORIN et al., 2012).

O tecido adiposo e a medula óssea são derivados do mesênquima embrionário, suas CT podem ser facilmente isoladas *in vitro* e diferenciadas em linhagens celulares mesodermas (ZUK, 2002). A obtenção de CTM a partir da medula óssea requer um procedimento cirúrgico que pode ser desconfortável para o paciente e resultar em um número limitado de células. Contudo, o tecido adiposo surge como uma nova fonte de CTM mais acessível.

As CTM têm a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, com um tempo de duplicação que depende da origem das células e da densidade com que foram plaqueadas no início da cultura. (BYDLOWSKI et al., 2009).

Ovinos têm sido propostos como modelos para uma vasta gama de aplicações biomédicas e em estudos com CT, inclusive em outras regiões do país

(SHEERLINCK et al., 2008). Os animais criados na região semiárida, assim como os demais, estão expostos a fatores de risco, como também são susceptíveis a doenças degenerativas que possam causar lesões teciduais. Com isso, o médico veterinário deve buscar alternativas terapêuticas que conduzam a cura das lesões, beneficiando-se de técnicas e recursos locais.

O uso de CT como alternativa no tratamento de lesões ortopédicas em medicina veterinária tem ganhado cada vez mais espaço, bem como o incentivo em pesquisas translacionais para o desenvolvimento desta técnica, principalmente para a aplicação clínica em animais domésticos (MEMON et al., 2005).

Antes do uso padrão de CTMs em aplicações clínicas, torna-se necessário avaliar melhor suas propriedades terapêuticas, bem como tentar compreender os mecanismos envolvidos em sua função imunomodulatória. Além do conhecimento de fatores intrínsecos ao doador que podem influenciar no sucesso da terapia, tais como expectativa de vida, idade e sexo. Acredita-se que a idade do doador influencie sobre o potencial de diferenciação, como também que CTM cultivadas para uso a longo prazo não sejam viáveis (COLOSIMO et al., 2013).

O conhecimento sobre o comportamento *in vitro* de CTMs obtidas do tecido adiposo de ovinos criados na região do Submédio do Vale do Rio São Francisco pode levar ao desenvolvimento e possível aplicabilidade de técnicas de terapia celular ainda pouco avaliadas nos exemplares de raças exploradas na região, sobretudo animais sem padrão racial definido (SPRD), que constituem uma boa parte dos rebanhos da região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ovinocultura no Submédio São Francisco

O Vale do Submédio São Francisco apresenta características peculiares, como seu clima tropical semiárido, temperaturas anuais médias de 27°C e baixos índices pluviométricos. A região que engloba municípios da Bahia e de Pernambuco, como Juazeiro-BA e Petrolina-PE, destaca-se internacionalmente como grande exportadora de frutas e um emergente mercado produtor de vinhos, demonstrando bastante dinamismo econômico (CODEVASF, 2010).

A ovinocultura, a princípio bastante explorada na região sul do Brasil, passou a ter maior expressividade em outras regiões. No nordeste, por exemplo, onde a criação é caracterizada por raças deslanadas e com melhor adaptação ao clima semiárido, o rebanho atualmente é considerado o maior do país. O foco das explorações é produzir couro e, principalmente, carne de qualidade a fim de atender a demanda do mercado consumidor interno que tem demonstrado um aumento em sua procura (CAVALCANTE et al.,2005; VIANA, WAQUIL e SPOHR, 2010).

A atividade pode adequar-se aos diversos ecossistemas brasileiros, podendo trazer muitos benefícios para quem a explora, desde que seja devidamente conduzida quanto aos seus aspectos ambiental, econômico e social (SIMPLÍCIO, 2001). O estado de Pernambuco possui 1.830.647 cabeças de ovinos, o que representa 19% do rebanho nordestino, sendo que Petrolina é uma das microrregiões que concentra quase 2/3 do efetivo do rebanho estadual (IBGE, 2014).

A ovinocultura é uma das mais importantes atividades econômicas do semiárido nordestino, apresentando-se como uma das alternativas mais apropriadas para gerar crescimento econômico e benefícios sociais (CORREIA et al.,2011; SANTOS e SANTOS, 2010). Adicionalmente, esses animais também podem ser utilizados como fonte de células-tronco para fins de estudo e implantação de novas técnicas, que podem levar ao desenvolvimento da região.

2.2. Células-tronco

As células-tronco (CT) são células precursoras de vários tipos celulares que constituem o organismo. Estas células possuem propriedades determinadas por

duas características fundamentais, capacidade de auto-renovação por divisão celular e de diferenciação em tipos celulares de linhagens específicas (plasticidade) (ZECH, 2004; WU et al., 2007; MALAVER-ORTEGA et al., 2012). A auto-renovação é uma característica indispensável à manutenção dos tecidos, e a plasticidade constitui uma habilidade intrínseca que torna estas estruturas tão especiais (BRUGGER et al., 2000).

Todos os tecidos possuem reservas de CT, e a principal função destas células encontradas em regiões perivasculares é substituir células perdidas e atuar na regeneração de tecidos que sofrem alguma lesão, ou são acometidos por doenças (MARX, SILVEIRA e NARDI, 2015). Essas células secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que executam diferentes funções no processo de regeneração tecidual (CAPLAN, 2007).

Os mecanismos terapêuticos das CT em medicina regenerativa ainda não foram completamente elucidados. Porém, cada vez mais se torna evidente a função parácrina imunomoduladora destas células, seja pela secreção independente ou associada de fatores de crescimento e moléculas bioativas (FORTIER e TRAVIS, 2011).

Inicialmente foram descritas as células-tronco embrionárias (CTE) que, dadas as suas propriedades de auto-renovação e pluripotência, oferecem a possibilidade de uma fonte ilimitada e renovável de células que podem se diferenciar em qualquer célula do organismo, tendo assim um apelo substancial como recurso terapêutico (WHITWORTH e BANKS, 2014).

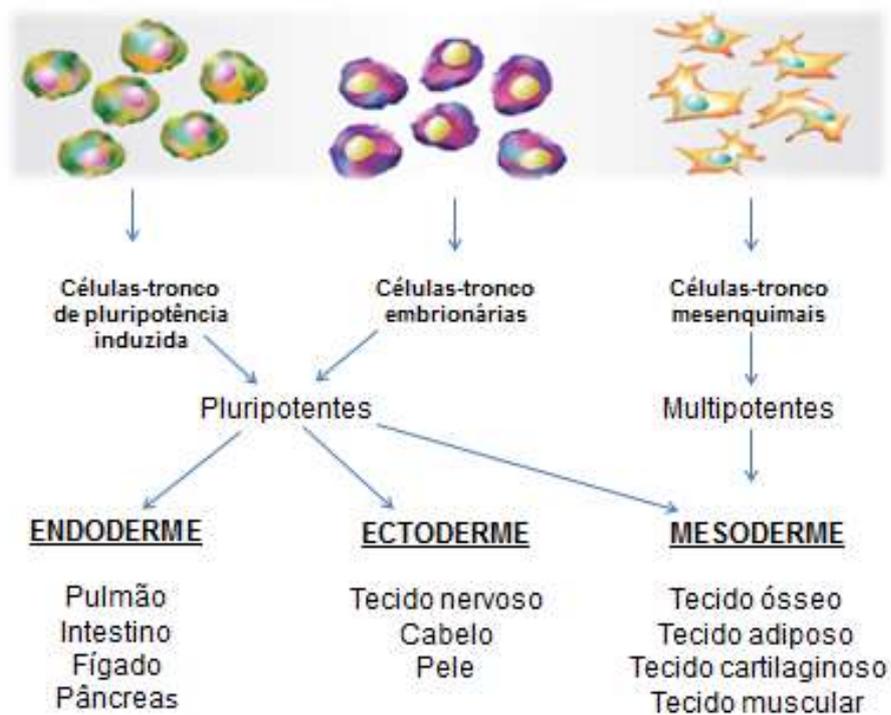
As CTE podem originar células das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme). Contudo, possuem limitações em sua aplicabilidade clínica por apresentar risco oncogênico e imunogenicidade, além das questões éticas, culturais e políticas envolvidas com relação ao seu uso (TAKAHASHI et al., 2007).

Os animais vertebrados possuem dois tipos de CT: as CT embrionárias e as CT adultas (DEL CARLO, MONTEIRO E ARGÔLO NETO, 2008). As CT embrionárias podem ser derivadas do zigoto, como também da massa celular interna do blastocisto (YAMANAKA, 2007; ZUTTON et al., 2013), enquanto que as CT adultas originam-se de vários tecidos do organismo adulto (Figura 1).

No que se refere à plasticidade, as CT podem ser classificadas com base no seu potencial para derivar outras células, como em totipotentes, pluripotentes ou

multipotentes. As CTE, totipotentes e pluripotentes, são capazes de formar todos os tipos celulares do organismo adulto, sendo que, exclusivamente, as totipotentes podem também originar células de tecidos extraembrionários e placenta. Já as CTA multipotentes possuem potencial de diferenciação restrito às linhagens mesodermiais (WATT e DRISKELL, 2010; ZUTTON et al., 2013).

Figura 1 – Tipos de células-tronco. Adaptado de Whitworth e Banks (2014).



Nesse contexto, surgem as células-tronco de pluripotência induzida, originadas a partir da reprogramação de células somáticas para torná-las pluripotentes pela transdução de fatores de transcrição característicos de CTE (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006). O isolamento de CT e a geração de CT pluripotentes induzidas têm revolucionado o desenvolvimento de pesquisas na área de biologia celular (THOMSON et al., 1998; YU et al., 2007; MALAVER-ORTEGA et al., 2012).

As CT de pluripotência induzida já foram geradas a partir de uma variedade de espécies de animais domésticos e de células de diferentes tecidos, incluindo do tecido adiposo de ovinos (MROZIK et al.,2010; SARTORI, 2012), que são comumente utilizados como modelo animal em pesquisas envolvendo CT.

2.3. Células-tronco mesenquimais

A célula-tronco adulta (CTA) é uma célula indiferenciada encontrada entre as células diferenciadas de um tecido ou órgão. As CTM, por sua vez são um tipo de CTA, que podem ser encontradas em vários órgãos e tecidos do organismo, sendo localizadas preferencialmente em regiões específicas do tecido, como as regiões perivasculares, mas podem haver nichos difundidos em outras regiões teciduais (GRITTI; VESCOVI e GALLI, 2002).

A proporção em relação aos outros tipos celulares é baixa, o que torna estas células difíceis de identificar, isolar e purificar. A medula óssea é uma importante fonte de CTA, podendo originar CT hematopoiéticas, responsáveis pela produção de tipos celulares sanguíneos, e as CT mesenquimais, que produzem várias linhagens celulares. Ambas podem ser encontradas na medula óssea, mas as CT mesenquimais podem ser encontradas em outros tecidos (ZAGO e COVAS, 2006, BAGLEY et al., 2009).

Presentes em diversos tecidos adultos as CTMs podem ser encontradas entre as células já diferenciadas de tecidos específicos, entretanto são células indiferenciadas e em sua maioria do tipo multipotente (MARQUES, 2006; MEIRELES et al., 2009), caracterizadas pela capacidade intrínseca de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, como também pela capacidade de diferenciação *in vitro* em fibroblastos, osteoblastos, cardiomiócitos, condroblastos, células epiteliais, neurônios e adipócitos quando adequadamente estimuladas (HAYNESWORTH et al.,1992; CAMPAGNOLI et al.,2001; DOMINICI et al.,2006; LIU, ZHUGE e VELAZQUEZ, 2009).

As CTMs são excelentes candidatas à terapia celular em medicina regenerativa por apresentarem relativa falta de imunogenicidade, baixo risco oncogênico, facilidade de isolamento e amplo potencial de diferenciação. Como também pela possibilidade de transplante autólogo ou heterólogo (HELMY et al. , 2010; NERY et al., 2013).

CTMs expressam antígenos de superfície que funcionam como marcadores, os quais podem ser identificados por anticorpos específicos que ao serem utilizados tornam possível a caracterização imunofenotípica deste tipo celular (COPLAND et al., 2008). Através da citometria de fluxo pode-se analisar o fenótipo celular, a partir da marcação de moléculas CD (*cluster of differentiation*), que são usadas para identificar tipo celular, estágio de diferenciação e atividade celular dos isolados (MACEY, 2007).

Os efeitos terapêuticos são caracterizados através de propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, que fazem com que CTMs sejam escolhidas para o tratamento de doenças inflamatórias ou imunomediadas, uma vez que elas podem atuar na ativação de mecanismos que estão envolvidos na reparação tecidual de tecidos lesados (WHITWORTH e BANKS, 2014; MARQUEZ-CURTIS et al., 2015).

As CTM têm sido isoladas e caracterizadas em diferentes tecidos do corpo, onde se encontram em estado quiescente e são responsáveis pela manutenção da homeostase dos tecidos, com o seu papel de repor células perdidas por maturação, envelhecimento ou danos (BARRY e MURPHY, 2004).

Essas células foram descritas pela primeira vez por Friendstein (1970), que isolou células estromais de medula óssea de camundongos *in vitro*, e têm sido amplamente isoladas de uma variedade de tecidos extramedulares, como pâncreas, tecido adiposo, tecido muscular, periósteo e cordão umbilical (CAPLAN, 1991; PRENTICE & TARNE, 2007; MONTEIRO et al., 2010).

Acredita-se que a função de CT transplantadas na melhora da regeneração em tecidos lesados seja atribuída a sua ação parácrina, ou seja, na liberação de moléculas biotivas como citocinas, fatores de crescimento, além de outras moléculas em resposta a estímulos inflamatórios (BOULANGER e SHATZ, 2004). CTMs podem ser encontradas em nichos ou microambientes especializados que possuem papel importante na regulação do comportamento celular, sobretudo na homeostasia e reparo tecidual (SCHOFIELD, 1978; VOOG, D'ALTERIO e JONES, 2008).

A medula óssea e o tecido adiposo representam fontes de CTMs com maior facilidade de acesso, além da alta capacidade proliferativa, quando comparada com células isoladas de outros tecidos (RUIZ-IBÁN et al., 2011). A atividade parácrina de CTMs derivadas de diferentes tecidos faz com que essas células realizem funções anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e antifibróticas, além de induzirem angiogênese, atividade mitogênica e propriedades regenerativas (CAPLAN, 2007).

CTMs demonstram compartilhar características similares entre as diferentes espécies, fato que influenciou a aplicação desta linhagem celular em estudos translacionais utilizando modelos animais (HEIDARI et al.,2013). Essas células já foram isoladas e diferentes tecidos em ovinos como cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, fluido amniótico, polpa dental e ligamento periodontal (CALLONI et al., 2014).

CTMs derivadas do tecido adiposo possuem características similares às células derivadas da medula óssea, como marcadores de superfície e potencial de diferenciação, considerando-se uma alternativa promissora devido a sua alta disponibilidade, excelente capacidade de expansão e proliferação. Além de apresentar plasticidade sob condições apropriadas (LIN et al.,2004; RAINLY et al.,2007; NIEMEYER et al.,2010).

2.4. Tecido adiposo

Houve um crescente interesse na biologia do tecido adiposo, que aos poucos passa a ser visto não somente por ser um depósito de armazenamento de lipídeos, mas também pelo fato de os adipócitos também exercerem uma função no equilíbrio energético e homeostase corporal em geral (VANCE e VANCE, 2002).

A descoberta de CTMs em lipoaspirado humano permitiu o incentivo a pesquisas que resultaram no desenvolvimento de linhagens celulares a partir do tecido adiposo humano e também em modelos animais (ZUK et al., 2001). Considerado um tecido conjuntivo com propriedades especiais, o tecido adiposo é constituído por adipócitos, caracterizado morfológicamente por células grandes, esféricas e com núcleo excêntrico (ROBBINS e COTRAN, 2005).

Os adipócitos são as unidades funcionais e podem ser encontrados isoladamente ou em grupos participando da formação do tecido adiposo, que é constituído quase inteiramente por essas células. O tecido adiposo subcutâneo é composto ainda por camadas de tecido conjuntivo, fibras nervosas, estroma vascular, células imunes, fibroblastos e pré-adipócitos (PACHLER et al., 2007).

Apesar de muitos tecidos serem fontes de CTA, o tecido adiposo representa uma fonte abundante de células para transplantes, que podem ser mais facilmente obtidas através de métodos menos onerosos e mais baratos. Neste tecido

encontram-se células progenitoras que estão inseridas entre os adipócitos (GIMBLE e GUILAK, 2003; YARAK E OKAMOTO, 2010).

O tecido adiposo está diretamente envolvido na homeostase, metabolismo energético, função neuroendócrina, regulação imune e proteção de órgãos vitais (LIU, ZHUGE e VELAZQUEZ, 2009). Este tecido deriva-se do folheto embrionário mesodermal e constitui-se de uma população de células estromais heterogêneas, como células do músculo liso, células endoteliais vasculares e CT (ZUK et al., 2001).

Os pré-adipócitos derivam-se de CTE multipotentes de origem mesodérmica e com capacidade de se diferenciar em outros tecidos. Assim, no organismo adulto, essas células podem ser ativadas e diferenciadas em adipócitos de acordo com a necessidade para o armazenamento de gordura seja requerida (GREGOIRE et al., 1998; SOUZA, ARRUDA e RONDIA, 2009).

O tecido adiposo constitui uma fonte abundante com população homogênea de CTM de fácil cultivo (ANVERSA, SUSSMAN E BOLLI, 2004). Estudos já demonstraram o isolamento de CTMs deste tecido em diversos animais domésticos, como em ovinos (GRZESIAK et al.,2011), caprinos (REN et al.,2012), ratos (BARCO et al., 2015), suínos (QU et al.,2007), cães (NEUPANE et al.,2008), gatos (KONO et al.,2014), equinos (BRAVO et al.,2012).

Na medicina veterinária regenerativa a utilização de CTMs derivadas do tecido adiposo é uma das abordagens adotadas em protocolos para o tratamento de lesões em tendões, ligamentos, cartilagens e articulações em cães e cavalos (FORTIER e TRAVIS, 2011).

Nas últimas décadas muitos grupos de pesquisa têm focado os seus objetivos de estudo na caracterização de CTM obtidas de diferentes espécies, dentre essas a espécie ovina. Entretanto, as principais pesquisas têm sido realizadas com CTM extraídas da medula óssea, quando comparadas com estudos feitos com CTM derivadas do tecido adiposo (LYAHYAI et al.,2012).

Apesar da população de células extraídas do tecido adiposo possuírem propriedades funcionais muito similares a CTMs derivadas da medula óssea, elas podem apresentar diferenças na expressão de fatores imunofenotípicos de superfície celular (STREM et al.,2005).

As CTMs derivadas do tecido adiposo são células pós-embrionárias ou adultas com capacidade de diferenciação em tecidos conjuntivos de linhagens celulares não hematopoiéticas (REN et al.,2012). Essas células podem ser

encontradas ao longo de toda vida, assim, a perda de adipócitos resulta em mecanismos de retroalimentação, que restauram os níveis lipídicos e o número de adipócitos perdidos por dieta ou cirurgicamente (VANCE e VANCE, 2002).

2.5. Cultivo celular

As propriedades de tipos celulares como as CT levaram ao desenvolvimento de métodos para isolar e caracterizar CTM derivadas de diversos tecidos (MALEKI et al., 2014). Assim, CT podem ser coletadas e cultivadas *in vitro* para estudo de sua utilização terapêutica (DONOVAN e GEARHART, 2001).

O cultivo de células pode ser utilizado para diversos fins, dentre eles a produção e manutenção de células de origem hematopoiética, diagnóstico de agentes patológicos, produção de reagentes e vacinas, teste de fármacos, preservação de material genético e estudos com CT (LEON-QUINTO et al., 2011).

É possível, *in vitro*, isolar as células-tronco, sob condições adequadas induzir seu cultivo e sua proliferação, como também estudar as funções e mecanismos celulares de sinalização. Alguns estudos têm realizado estas etapas, como também a manipulação da capacidade de diferenciação destas células em diversos tecidos do organismo. Avalia-se também o desenvolvimento destas células em diferentes meios de cultivo, com o objetivo de viabilizar o uso dessas estratégias na biotecnologia e terapia celular (YUSPA, 1998; AMORIN et al., 2012).

As CT podem ser isoladas dos tecidos utilizando-se métodos enzimáticos ou até mesmo pela separação por gradientes de concentração. Conforme Carrel e Burrows (1910) também é possível extrair as células pelo método de explante, as células do fragmento inicial, previamente aderido à placa de cultivo, migram para fora do tecido a partir da periferia do fragmento, aderindo-se e se multiplicando sobre a placa de cultura.

As células podem ser cultivadas em meios de cultura, que permitem o estudo do comportamento e metabolismo celular em condições melhores definidas do que no corpo do animal. As culturas possibilitam o estudo de movimentos celulares, da mitose, da ação de diversas substâncias sobre as células e da secreção pelas células, de produtos que irão acumular-se no meio de cultura, condicionando-o (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Os elementos constituintes dos meios de cultura são fundamentais para o desenvolvimento celular, em qualidade e quantidade, pois este fator provém condições fisiológicas necessárias para o cultivo das células (ZHU, 2012).

CTMs são frequentemente isoladas e cultivadas em meio de cultura enriquecido, e apresentam dentre outras características a adesão ao plástico. Células sanguíneas também podem aderir, mas, com as várias trocas do meio de cultura e após algumas passagens em cultura, são removidas, juntamente com a eliminação da maior parte das células contaminantes do cultivo e debris celulares, que permanecem em suspensão (JAVAZON, BEGGS e FLAKE, 2004; BYDLOWSKI et al. 2009).

Quando cultivadas durante períodos prolongados, a expansão *in vitro* de CTMs pode causar alterações significativas em características fenotípicas, como morfologia alterada e diminuição da proporção núcleo-citoplasma, e na plasticidade destas células (COLOSIMO et al., 2013). O que pode inviabilizar o transplante de células cultivadas *in vitro* em longo prazo. Conforme Bonab et al. (2006) as CTM isoladas da medula óssea demonstraram anormalidades morfológicas após 3 meses de cultivo.

Uma possibilidade para manter células em passagens iniciais por longos períodos é a criopreservação. Uma ferramenta biotecnológica, que permite a preservação de CTMs por longos períodos, permitindo também a viabilidade destas células após armazenamento ou transporte. Esta etapa exige alguns cuidados especiais para evitar que haja danos a integridade celular ou lise das células. Portanto, deve-se ter conhecimento sobre as respostas das CTMs para as mudanças físicas que o congelamento ocasiona, de modo a minimizar lesões e permitir o melhor aproveitamento de CTMs funcionais (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015).

2.6. Proliferação e diferenciação celular

As CTMs podem contribuir para melhorar a regeneração tecidual através da diferenciação em células específicas de um tecido no qual são implantadas, como também pela secreção de fatores que otimizam a função das células adjacentes (MURPHY et al., 2003).

A propriedade de auto-renovação das CT é expressa por dois tipos de divisão celular, simétrica e assimétrica. Na divisão simétrica, as CT originam duas células indiferenciadas e com características idênticas. Já na divisão assimétrica, algumas CT podem gerar CT indiferenciadas, ao tempo que outras geram somente células comprometidas em se diferenciarem (SANDERS et al.,2006).

A diferenciação ocorre quando uma célula assume nova morfologia e característica funcional. CT adultas podem ser induzidas a este processo a partir da administração de fatores de crescimento e agentes indutores, presentes em meios de cultura específicos (THEISE e KRAUSE, 2002; WURMSER, PALMER e GAGE, 2004).

Dentre os constituintes do meio de cultura, o SFB pode influenciar na proliferação celular. Diferentes concentrações podem interferir na qualidade, funcionalidade, imunomodulação e potencial de diferenciação das CTMs *in vitro* (HEIDARI et al.,2013).

Além de poder ser feita com a intenção de desenvolver aplicabilidade clínica, como na regeneração de tecidos lesados, a diferenciação celular, ainda pode ser induzida em busca de conhecimento sobre processos biológicos que ocorrem no interior dessas células (GRZESIAK, 2011). O potencial de diferenciação de CTMs pode ser confirmado pela indução da diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos sob condições apropriadas de cultura (HEIDARI et al.,2013).

Para obtenção de uma linhagem celular osteogênica, por exemplo, uma camada confluyente de células-tronco mesenquimais deve ser incubada em meio indutor que contenha reagentes específicos, tais como β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona, por um período de 2-3 semanas (ZHANG et al.,2008)

É possível realizar a caracterização fenotípica de CTMs, a partir da utilização de um conjunto de anticorpos monoclonais capazes de avaliar a expressão de antígenos de superfície normalmente expressos por células-tronco. Através de protocolos utilizando, por exemplo, o citômetro de fluxo, há como avaliar este parâmetro (DOMINICI et al., 2006).

A diferenciação de CTA é desencadeada por estímulos bioquímicos produzidos pelo microambiente em que a célula se encontra. Acredita-se que esses estímulos sejam gerados por citocinas que podem modular a atividade celular (TAKAHASHI et al., 2007).

Diferentes tecidos adultos diferem quanto à proporção de células proliferativas e quanto à natureza do comportamento de diferenciação, bem como mesmos tecidos que não possuam a capacidade de auto-renovação possam conter células estaminais (ZHAO et al., 2008).

Há forte evidência de que o comportamento das CT seja intensamente influenciado pelo seu local de desenvolvimento ou nicho, de modo que as células podem dividir-se simetricamente gerando duas CT ou duas células diferenciadas. Há possibilidade dela dividir-se de forma assimétrica resultando em uma CT e uma célula diferenciada. Diferentes componentes do nicho celular podem estar presentes, tais como matriz extracelular, células bastante próximas às CT, fatores de crescimento secretados e fatores físicos, representados pela tensão de oxigênio, rigidez e alongamento (MORRISON e SPRADLING, 2008; WATT e DRISKEL, 2010).

O nicho é caracterizado por todos os fatores que efetivamente estão próximos às CT quando elas se encontram em seu estado indiferenciado, incluindo as demais células que estão em contato direto, matriz extracelular e moléculas solúveis ou ligadas. Todos esses fatores mantêm as CT em estado indiferenciado. De acordo com a necessidade de regeneração tecidual, uma série de sinais pode ser desencadeada no nicho para que a célula expresse, prontamente, o seu potencial de diferenciação (KOLF, CHO e TUAN, 2007).

A busca pelo conhecimento do comportamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo de ovinos, bem como da sua capacidade de proliferação *in vitro* pode ser o passo inicial para aplicação de biotecnologias com base em CT nos animais da região semiárida.

3. JUSTIFICATIVA

A caprinocultura e a ovinocultura têm se destacado no agronegócio brasileiro, com representatividade em vários estados. Neste cenário, há principalmente uma concentração na região de Petrolina do total de ovinos criados no estado de Pernambuco. O aumento na busca e o interesse pelo desenvolvimento da ovinocultura torna necessário o estudo de técnicas que possam aumentar o aproveitamento de animais que possuem altos padrões genéticos.

A aplicação de biotecnologia na criação de ovinos tem sido implantada progressivamente de modo complementar a práticas de manejos sanitário, nutricional e reprodutivo, buscando o sucesso da exploração, mesmo diante das adversidades impostas pelas condições climáticas da região.

Há uma grande relevância no conhecimento de ferramentas biotecnológicas que podem ser utilizadas com uma perspectiva terapêutica em diversas lesões que possam acometer os diversos tecidos desses animais, tendo como base os recursos locais. Ovinos são comumente utilizados como modelo animal em pesquisas biomédicas e aos poucos ganham espaço como modelo para pesquisas envolvendo células-tronco.

O uso da terapia celular em animais da região semiárida somente será estabelecido se anteriormente forem conduzidos trabalhos que isolem as células-tronco dos exemplares de raças criadas na região. A realização deste tipo de estudo além de produzir mais conhecimentos a cerca desta temática, poderá aumentar as possibilidades de aplicações clínicas desse tipo celular.

Além disso, devem-se estabelecer protocolos padronizados para o isolamento, cultivo e caracterização celular que alcancem os melhores resultados na espécie ovina, para que seja subsidiada a aplicabilidade a um médio prazo da técnica de modo a promover o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos para diversas patologias que acometem os animais domésticos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estabelecer um protocolo de isolamento, cultivo e caracterização morfológica de células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo de ovinos SPRD criados na região Semiárida do Submédio São Francisco.

4.2. Objetivos específicos

1. Isolar fragmentos do tecido adiposo de ovinos SPRD;
2. Estabelecer técnica de cultivo de CTMs;
3. Realizar a caracterização morfológica das CTMs;
4. Avaliar a viabilidade das células isoladas e o desempenho destas em cultivo, sob os aspectos de proliferação e contaminação;
5. Avaliar a capacidade de diferenciação das linhagens celulares mesodermiais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Considerações éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco e foi aprovado em outubro/2014 sob o Protocolo nº 0011/021014.

5.2. Local de execução e amostra experimental

A obtenção das amostras a partir dos animais foi realizada com a prévia ciência do Abatedouro Municipal de Petrolina-PE sobre o caráter experimental do estudo, firmada em carta de anuência entre o grupo de pesquisa e a direção do abatedouro.

Assim, a coleta das amostras de tecido adiposo foi realizada em ovinos SPRD, provenientes de propriedades de Petrolina e região. Os fragmentos de tecido adiposo foram coletados de diferentes animais da espécie ovina (*Ovis aries*), hígidos e aptos a serem abatidos. A coleta foi realizada durante o fluxo de abate, entre os estágios de sangria e esfolagem, totalizando 10 fragmentos amostrais de animais diferentes e de ambos os sexos.

A coleta foi realizada uma vez, porém as 10 primeiras amostras foram contaminadas. Na segunda vez, realizou-se a coleta de duas amostras que não contaminaram. Assim, as duas amostras foram utilizadas para realizar os ensaios deste experimento.

5.3. Coleta e remessa ao laboratório

A coleta foi realizada no turno da noite, logo após o início do abate dos animais. As amostras obtidas dos animais foram manipuladas separadamente, porém no mesmo dia de processamento. Os fragmentos de tecido adiposo subcutâneo foram coletados a partir da excisão do tecido localizado na região abdominal dos animais, com auxílio de material cirúrgico (pinça e tesoura anatômicas) esterilizado.

Em seguida, os fragmentos de tecido adiposo com aproximadamente 0,5 cm² foram submetidos à lavagem em soro fisiológico suplementado com 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), etapa realizada para prevenir a ocorrência de contaminações do material coletado e, posteriormente, durante o cultivo das células.

Após a lavagem, cada fragmento foi individualmente depositado em tubos Falcon de 50 mL esterilizados contendo 20 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (Sigma Chemical Co., EUA) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina. Todas as etapas foram executadas mediante aplicação de práticas assépticas de modo a evitar qualquer tipo de contaminação das amostras.

Os tubos foram vedados com plástico adesivo (Parafilm®) e acondicionados em caixa térmica a uma temperatura entre 4 e 8° C, sendo, posteriormente, remetidos ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), onde se realizou o processamento das amostras após 10 horas da coleta.

5.4 Isolamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo

O processamento das amostras deste estudo foi conduzido na sala de cultivo celular do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (Figura 2) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) situado em Salvador-Bahia.

O isolamento e cultivo das células foram baseados em protocolos já bem descritos na literatura, a exemplo de Nardi e Meirelles (2006). O meio de cultura utilizado foi DMEM suplementado com soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) a 10%, bicarbonato de sódio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 7,5%, piruvato de sódio 1 mM, L-glutamina (Sigma) 2 mM, 50 µg/mL de gentamicina, 100 µg/mL de estreptomicina e 30 µg/mL de penicilina (Sigma) e 2,5 µg/mL anfotericina B (Gibco Laboratories, Gaithersburg, EUA).

Figura 2 - Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.



No laboratório, as amostras foram processadas sempre em capela de fluxo laminar vertical de modo a evitar a contaminação. Os fragmentos de tecido adiposo foram retirados dos tubos de origem e, primeiramente submetidos a diversas lavagens em tubo Falcon de 50 mL contendo solução tampão fosfato salina suplementada com antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina e 60 µg/mL de penicilina).

Após a lavagem, os fragmentos (de aproximadamente 0,5 cm²) foram depositados em tubos Falcon contendo meio DMEM incompleto, ou seja, sem adição de SBF, com solução de tripsina 0,25% (Invitrogen, Brasil), na proporção 1:1, no volume final de 20 mL. Realizou-se então o corte mecânico das amostras fragmentares com auxílio de tesoura anatômica, previamente esterilizada, até reduzir o tamanho dos fragmentos a cerca de 1 mm³.

Após o fracionamento, os tubos foram postos em banho-maria a 37° C, para otimizar a ação enzimática da tripsina no tecido, onde permaneceram durante 45 minutos. A cada 5 minutos, os tubos foram homogeneizados em agitador mecânico para que a reação enzimática ocorresse de maneira uniforme em toda superfície dos fragmentos. Em seguida, adicionou-se meio DMEM suplementado com SBF para

interrupção da ação enzimática. Posteriormente, os tubos foram submetidos à centrifugação a 462 g a 4°C, durante 10 minutos.

O *pellet* obtido foi coletado e depositado em tubos de 15 mL, e submetidos a mais três centrifugações e ressuspensões. Depois deste procedimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM suplementado.

5.5 Cultivo de células-tronco derivadas do tecido adiposo

A suspensão celular obtida foi distribuída em placa de 24 poços (TPP, *Trasadigen*, Suíça), em 1 mL/ poço de meio DMEM suplementado com 10% de SBF, 100 µg/mL de estreptomicina e 60 µg/mL de penicilina, e mantidas em estufa umidificada à 37° C com 5% de CO₂ para aderência aos poços e proliferação celular.

Após 24 horas, o meio foi descartado, realizou-se a lavagem com solução salina estéril e adicionou-se meio DMEM suplementado com 2,5 µg/mL de anfotericina B, descartando as células em suspensão e não aderentes ao plástico da placa. Essa manutenção das placas repetiu-se a cada dois dias. Após sete dias de cultivo e das células atingirem confluência quase total (90-100%) realizou-se a expansão da cultura pela primeira vez, permitindo a continuidade da proliferação.

5.6. Viabilidade celular

A viabilidade das CTMs pôde ser avaliada através da aplicação do teste de exclusão do corante Azul de Trypan utilizando câmara de Neubauer®. Após tripsinização e centrifugação das CTMs, o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM, uma alíquota de 10 µL das células foi diluída em solução com Azul de Trypan a 1% e realizada a contagem das células viáveis, ou seja, as células não coradas em azul (BUNNEL et al.,2008;BRAVO et al. 2012). As células foram plaqueadas na concentração de 1x10⁴ células/mL.

O acompanhamento do processo de isolamento, desenvolvimento da cultura e a caracterização morfológica das células isoladas foram realizados utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). A caracterização morfológica e descritiva foi realizada através do acompanhamento das culturas, por microscopia óptica durante todo o experimento.

5.7. Expansão de CTMs derivadas de tecido adiposo

As células aderentes foram desprendidas da superfície plástica. Após troca do meio por solução salina estéril e sua retirada, adicionou-se solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen, Brasil) em cada poço. Em seguida, a placa foi incubada durante 5 minutos em estufa a 37°C, 5% CO₂ para que ocorresse o desprendimento das células da superfície da placa pela ação enzimática.

Após observar em microscópio óptico invertido que houve o desprendimento das células, adicionou-se meio DMEM suplementado com SBF a 10% aos poços para interrupção da ação enzimática. Assim, com auxílio de pipeta, o conteúdo de cada poço com as células em suspensão foi depositado em tubo Falcon de 15 mL, que foi submetido à centrifugação a 1500 RPM durante 5 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido e depositado em garrafas de cultura de 25 cm² com filtro, as quais foram adicionados 5 mL de meio DMEM suplementado com SBF a 10% e antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina e 60 µg/mL de penicilina). A cultura das CTMs derivadas do tecido adiposo foi mantida em estufa umidificada à 37° C com 5% de CO₂. Realizou-se a troca de meio a cada 2-3 dias e a expansão das células foi feita cada vez que a cultura atingiu cerca de 80-100% de confluência, sendo que na 2^a passagem as células foram expandidas para garrafas de 75 cm², e a partir da 3^a passagem todas as culturas foram expandidas em garrafas de 125 cm².

5.8. Análise citoquímica de CTMs – Panótico Rápido

As CTMs em 3^a passagem foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços na concentração de 1x10⁴ célula/ mL e incubadas em estufa umidificada a 37° com 5% de tensão de CO₂, durante 24 horas. Após 24 horas, realizou-se lavagem dos poços com solução salina estéril e a fixação das células com álcool absoluto por 10 min, à 4 °C.

As lamínulas foram retiradas dos poços e coradas com Kit Panótico Rápido LB. As lamínulas foram submersas durante 10 segundos em cada uma das três soluções do kit e em seguida foram lavadas com água deionizada. Após secarem ao ar na posição vertical, foram montadas em lâminas para posterior visualização.

5.9. Processamento de CTMs – Microscopia eletrônica de varredura

Análise morfológica das CTMs foi avaliada de forma descritiva por Microscopia eletrônica de varredura. As CTMs em 3ª passagem foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços na concentração de 1×10^4 cél/mL e incubadas em estufa umidificada à 37° com 5% de tensão de CO₂ durante 24 horas.

Após 24 horas, as lamínulas foram fixadas com o tampão Karnovsky: glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), em temperatura ambiente. Em seguida, foram submetidas a três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) com duração de 5 minutos cada a temperatura ambiente. Realizou-se a adesão das células à lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina (Sigma).

Posteriormente, as células foram pós-fixadas durante 30 minutos em solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) com duração de 5 minutos cada lavagem a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram gradativamente desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, e 100%), sendo que nas 4 primeiras concentrações, foram realizadas durante 15 minutos e, na última, foram 2 banhos de 10 minutos cada.

As células foram então submetidas ao ponto crítico, etapa que consiste na secagem final da amostra. As amostras foram depositadas na câmara de ponto crítico que realizou ciclos de lavagens com CO₂ líquido até a remoção total do etanol. Após a eliminação do etanol, a câmara foi aquecida à 40 °C, até todo o gás carbônico do sistema evaporar. Posteriormente, as células foram montadas em suporte (STUBS), metalizadas com ouro durante 5 minutos e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV a 10 kV em unidade de microscopia eletrônica - UME do CPqGM – FIOCRUZ -, onde as imagens foram adquiridas.

5.10. Criopreservação de linhagem de CTMs

Realizou-se a tripsinização em garrafas com células em 4ª passagem para proceder a criopreservação de linhagens celulares utilizadas no experimento. Após o

desprendimento da superfície plástica, o conteúdo da garrafa foi coletado em tubo falcon de 15 mL, que foram submetidos a centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi resuspenso em 1 mL de soro fetal bovino para a contagem e viabilidade celular.

Em seguida, as células foram depositadas em criotubos à concentração de 1×10^6 em solução de congelamento composta por 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) com volume final de 1 mL por criotubo. Os criotubos foram identificados e, imediatamente, transferidos para caixas de policarbonato e permaneceram em freezer a -20°C por cerca de 1 hora, sendo posteriormente armazenados em freezer a -80°C , onde permaneceram durante 60 dias.

5.11. Descongelamento de CTMS

Os criotubos foram retirados do freezer -80°C , e descongelados em banho-maria a -37°C . Em seguida, o conteúdo do criotubo foi depositado em tubo falcon com 10 mL de meio DMEM e submetido à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido. Realizou-se a contagem e a viabilidade das células, que foram depositadas em garrafas de cultivo de 25 cm^2 com 5 mL de DMEM e incubada por 24 em estufa a 37°C e 5% de CO_2 .

5.12. Ensaio de proliferação celular

As CTMs de ovino (1×10^4 células/poço, em 200 μL) foram cultivados em 6 poços com meio DMEM na placa de 96 poços por 48, 72 ou 96 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após os respectivos períodos de incubação, foi adicionado às culturas, 1 μCi de ^3H -timidina (Perkin Elmer, Waltham, MA), dando início a um novo período de 18 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 .

Após esse período, realizou-se a quantificação da proliferação, através da determinação da incorporação de ^3H -timidina ao DNA celular nos diferentes tempos de incubação. O conteúdo da placa foi coletado, automaticamente, em coletor múltiplo, através do qual as células foram transferidas da placa do experimento para uma placa filtro, que mantém a fita de DNA radioativa.

Em seguida, a placa filtro foi submetida à secagem *overnight*, e no dia seguinte adicionou-se 50 μL de líquido de cintilação. A leitura da placa foi realizada

em contador de radiação beta (Multilabel Reader, Finland), que possibilita a quantificação da ^3H -timidina incorporada a partir de contagens em CPM (contagem por minuto), unidade de medida de radiação, sendo o resultado expresso em planilhas com os valores de cada poço.

5.13. Ensaio de diferenciação adipogênica

Células foram plaqueadas em placa de 6 poços na concentração de 5×10^4 células/poço, em 2 mL meio DMEM. Após 24 horas, realizou-se a troca do meio por DMEM suplementado com 60 mM de indometacina, 0,5 mM dexametasona e 0,5 mM de isobutilxantina (Sigma). Um dos poços foi utilizado como controle, o meio deste poço era trocado apenas por meio DMEM. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Após a indução da diferenciação, durante 15 dias, os poços foram lavados três vezes com solução PBS. Em seguida, foram fixados com 3 mL paraformaldeído 4% durante 1 hora e depois os poços foram lavados com solução PBS. Adicionou-se 2 mL/poço da solução com Oil Red (Sigma-Aldrich) e após 10 minutos realizou-se mais uma lavagem com PBS. Os poços puderam ser visualizados por microscopia ótica para confirmação da coloração, avaliação qualitativa e registro das imagens.

5.14. Ensaio de diferenciação osteogênica

Células foram plaqueadas em placa de 6 poços na concentração de 5×10^4 células/poço, em 2 mL meio DMEM. Após 24 horas, realizou-se a troca do meio por DMEM suplementado com 10 mM de β -glicerol fosfato, 0,05 mM de ácido ascorbato fosfato e 100 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich). O poço com controle era trocado apenas por meio DMEM. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Após a indução da diferenciação, durante 15 dias, os poços foram lavados três vezes com solução PBS. Em seguida, foram fixados com paraformaldeído 4% durante 1 hora e os poços foram novamente lavados com solução PBS. Adicionou-se 2 mL/poço da solução com Alizarina Red (pH=4,2, Sigma-Aldrich) e após 10 minutos realizou-se mais uma lavagem com PBS. Os poços puderam ser visualizados por microscopia ótica para confirmação da coloração, avaliação qualitativa e registro das imagens.

5.15. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA EUA), sendo adotado um padrão de significância onde $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

As células foram isoladas do tecido adiposo subcutâneo de ovinos e expandidas em culturas confluentes de células aderentes, que apresentaram morfologia fibroblastóide, capacidade de formar colônias em monocamada e ausência de contaminação (Figura 3 e Figura 4).

Figura 3 - CTMs provenientes de tecido adiposo ovino visualizadas por microscopia óptica. (A) Cultura primária de células com morfologia pouco definida e presença de estruturas não aderidas (seta vermelha) após 3 dias de cultivo. (B) Células em 3ª passagem após 15 dias de cultivo, no aumento de 100X. (C) Células aderentes (aumento de 200X) com morfologia fibroblastóide (seta preta).

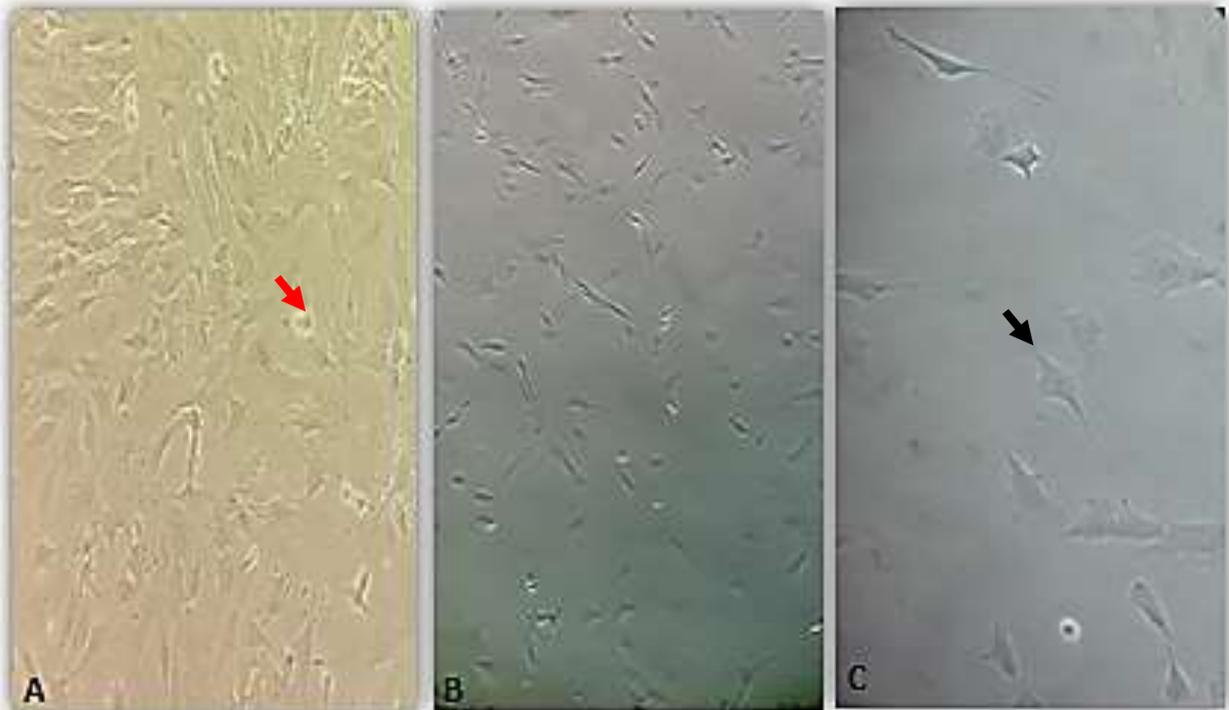
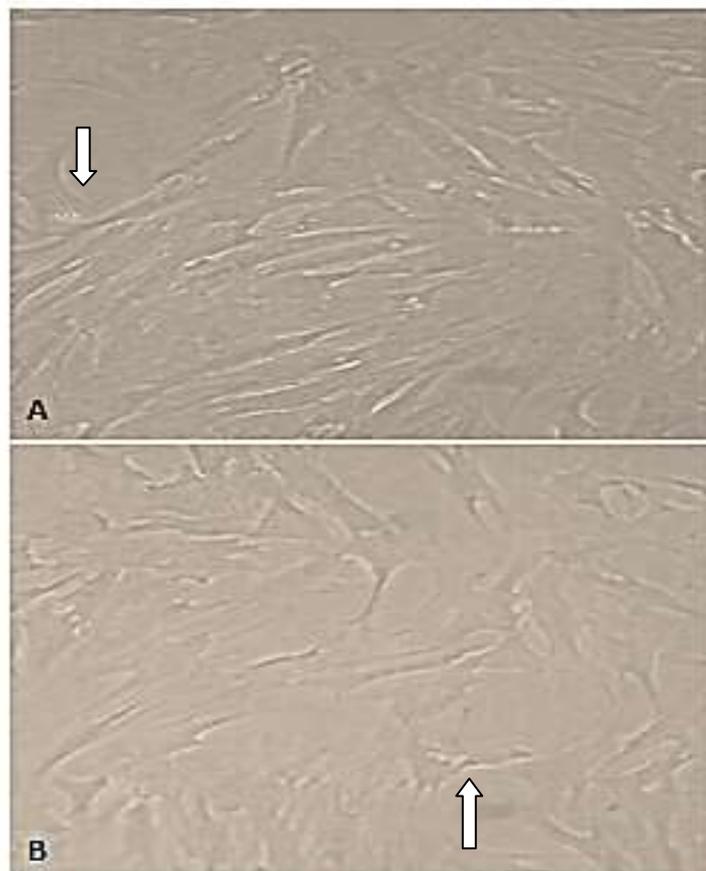


Figura 4 – Tubos com células extraídas do tecido adiposo após centrifugação.
Pellet formado por células isoladas no fundo dos tubos, indicado pela seta preta.



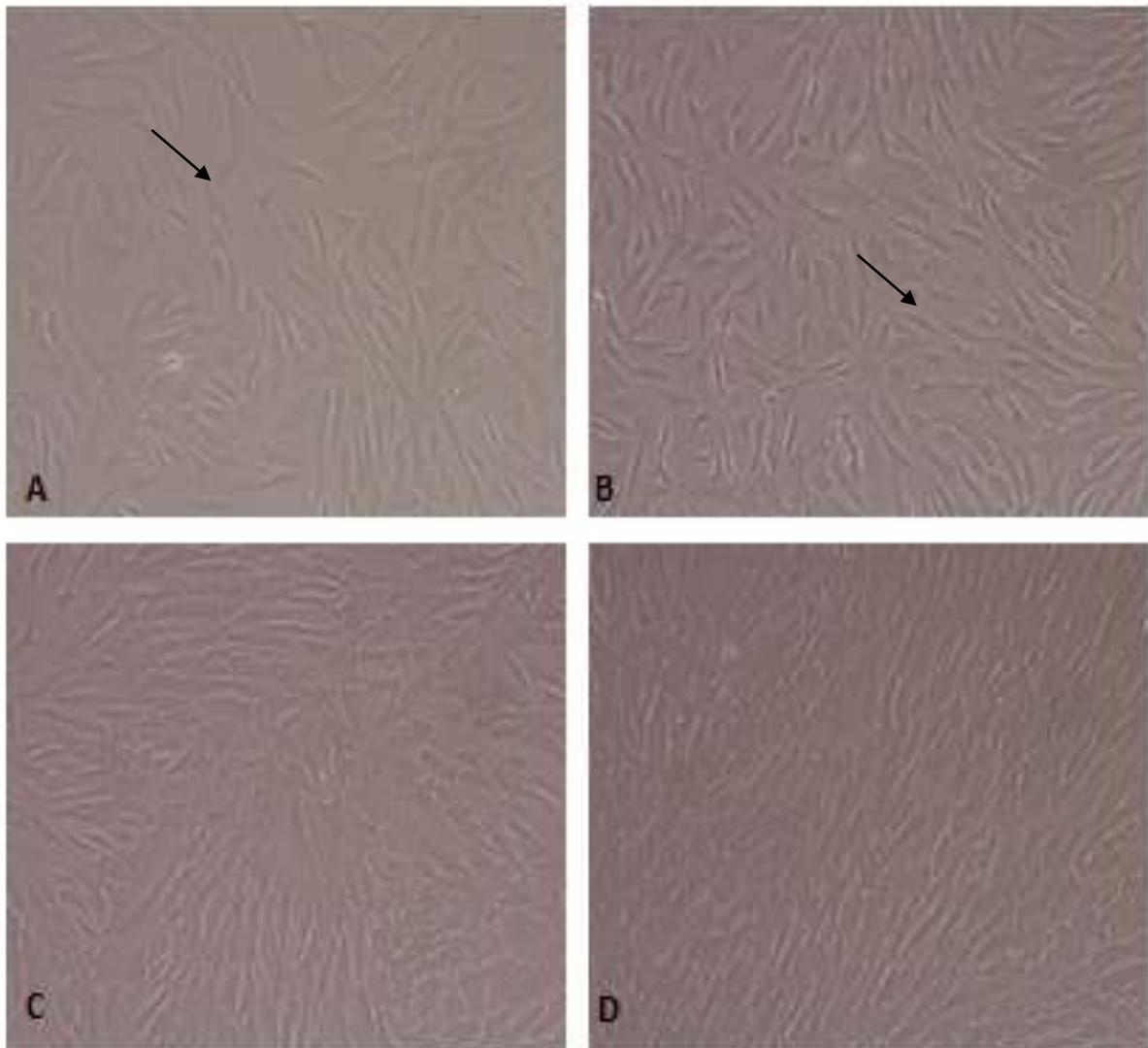
Após 24 horas do início do cultivo celular, pôde-se observar que a cultura primária era composta por uma população celular heterogênea, com células apresentando formato arredondado, iniciando o processo de adesão ao plástico. Células não aderidas foram eliminadas após a manutenção das garrafas durante a troca dos meios, que era antecedida de lavagem das culturas com Solução Salina estéril.

Figura 5 - Crescimento celular em monocamada aderente ao plástico visualizado por microscopia óptica. (A e B) Morfologia fibroblastóide (setas brancas) celular estável atingindo confluência total no aumento de 400X.



No segundo dia, foi possível observar que as células aos poucos se tornavam mais alongadas, e nos outros dias, a monocamada de células aderentes ao plástico tornava-se cada vez mais homogênea. Após a primeira semana de cultivo celular, constatou-se a presença de algumas células aderentes com morfologia fibroblástica e que eram capazes de formar colônias em monocamada (Figura 5).

Figura 6 - Morfologia de CTMs isoladas do tecido adiposo ovino visualizadas por microscopia óptica. (A) Cultura de CTMs esparsas com morfologia fibroblástica (seta), (B) células apresentando semi-confluência. (C e D) CTMs com bastante proliferação celular.



Após a expansão em 3ª passagem, as colônias de células apresentavam-se morfológicamente homogêneas e a quantidade de células era suficiente para a realização dos experimentos (Figura 6). Assim, as células entre a 3ª e 5ª passagem foram utilizadas nos demais ensaios deste estudo.

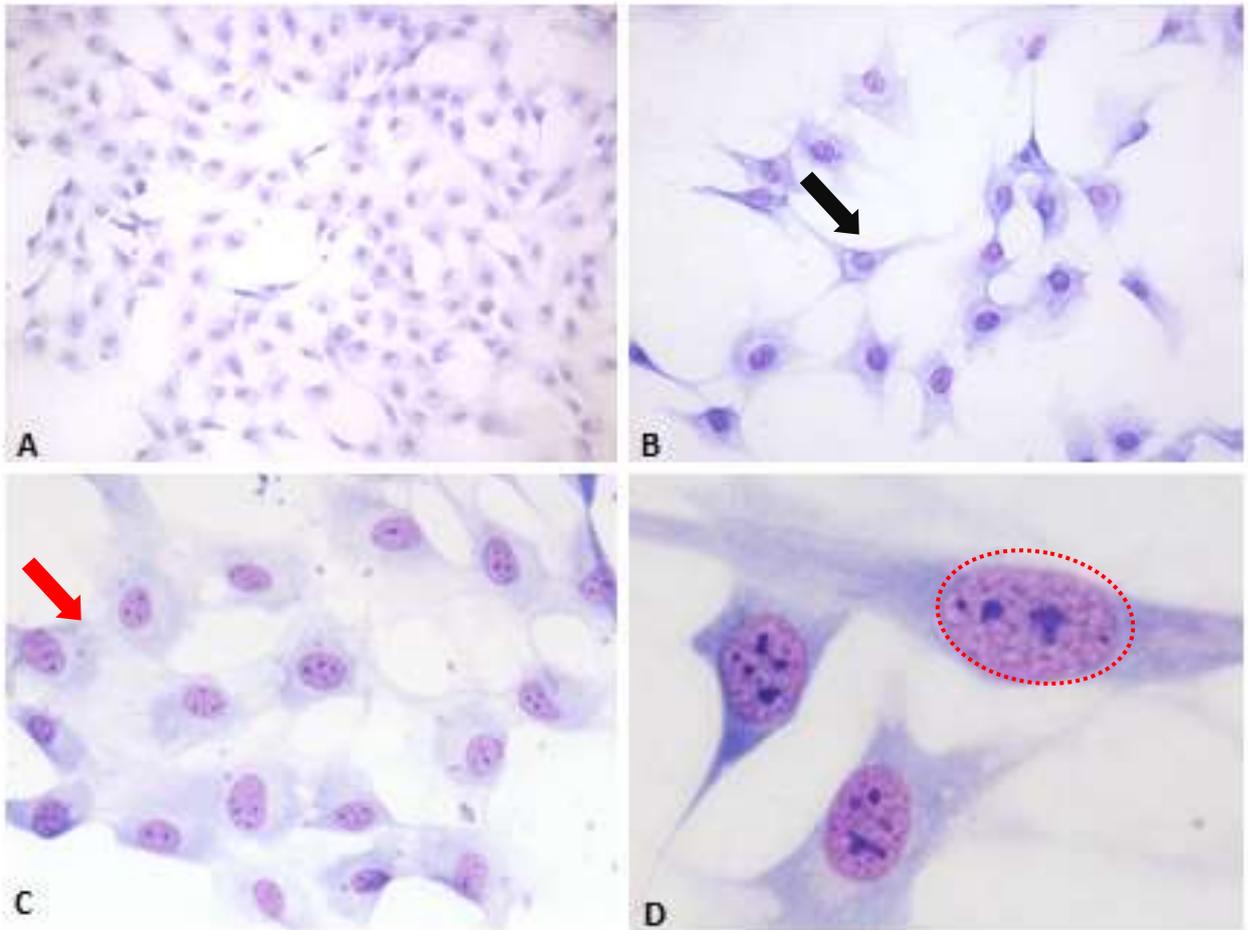
Todas as células isoladas a partir de amostras obtidas dos dois animais apresentavam morfologia fibroblastóide, que se preservou após 15 passagens em cultura, correspondente a 90 dias de cultivo, e após a criopreservação das células depois de 60 dias. Este tempo é significativo para considerar a presença de células com comportamento característico de células-tronco mesenquimais.

Após a criopreservação, as células foram capazes de estabelecer unidades formadoras de colônia que originaram uma monocamada de células aderentes com boa capacidade proliferativa, que foram expandidas algumas vezes. Contudo, foi necessário um tempo maior, cerca de 12 dias, para a cultura primária atingir confluência total.

Ao longo de todo o experimento, equivalente a três meses, as culturas desenvolveram-se bem, sendo que as células evidenciaram pouca ou quase nenhuma alteração morfológica perceptível, como ausência de grânulos ao redor dos núcleos, vacúolos citoplasmáticos, redução da proporção núcleo-citoplasma e destacamento das células da superfície da garrafa, que poderiam significar presença de algum fator citotóxico ou prováveis sinais de senilidade.

A análise citoquímica da cultura permitiu a visualização do arranjo das colônias celulares, constituídas por células bem definidas, com estruturas bastante delimitadas, núcleos centrais e bem arredondados (Figura 7).

Figura 7 - Características morfológicas de CTMs coradas em Panótico Rápido visualizadas por microscopia óptica. Células aderentes com formato fusiforme (seta preta). Células confluentes (seta vermelha) núcleos grandes, íntegros e centralizados (contorno tracejado vermelho). (A) 100X, (B) 200X, (C) 400X e (D) 1000X.



A microscopia eletrônica por varredura permitiu a visualização e registro dos detalhes ultraestruturais (Figura 8) das CTMs, como as projeções citoplasmáticas, que puderam ser bastante evidenciadas (Figura 9).

Figura 8 - Micrografia eletrônica de varredura de CTMs isoladas do tecido adiposo. Células fibroblastóides com estabilização da morfologia celular apresentando projeções citoplasmáticas.

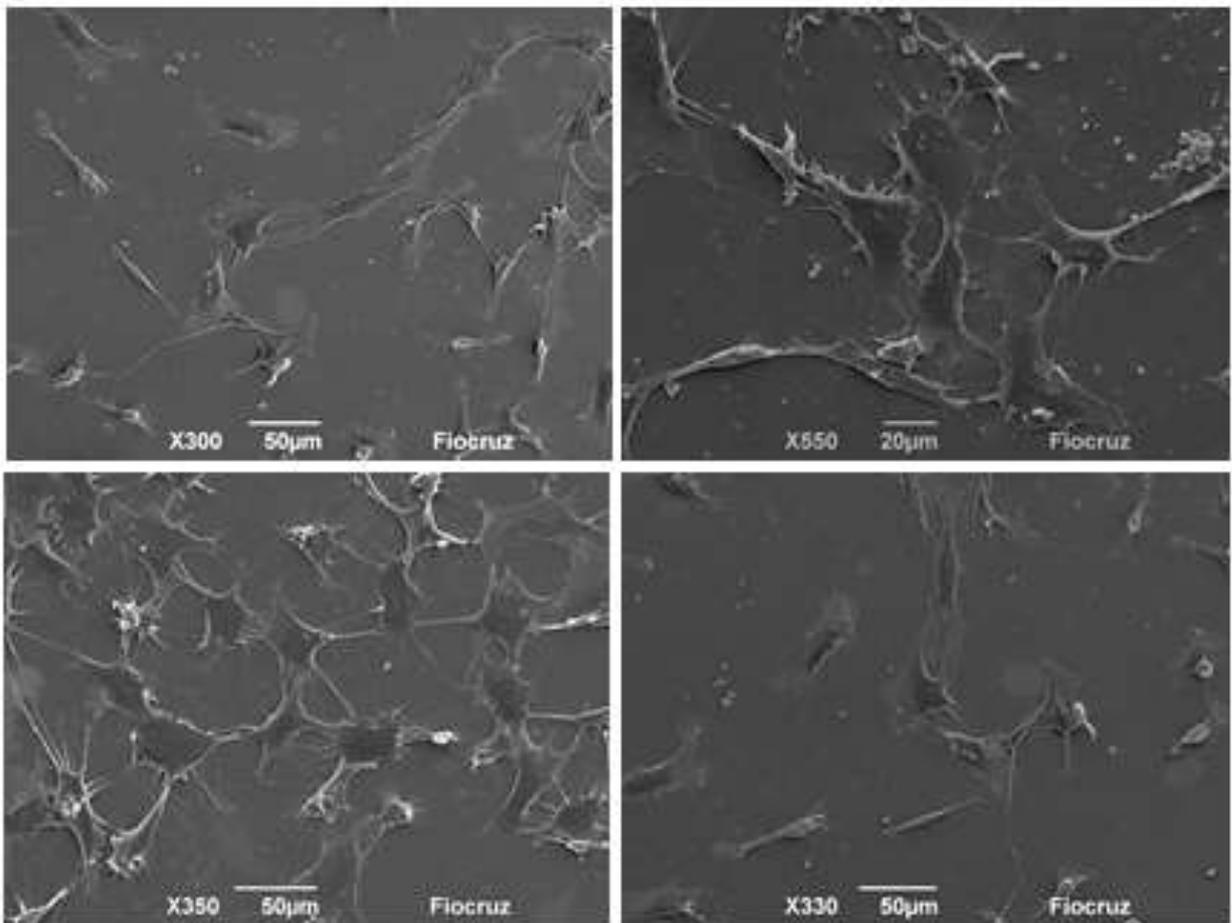
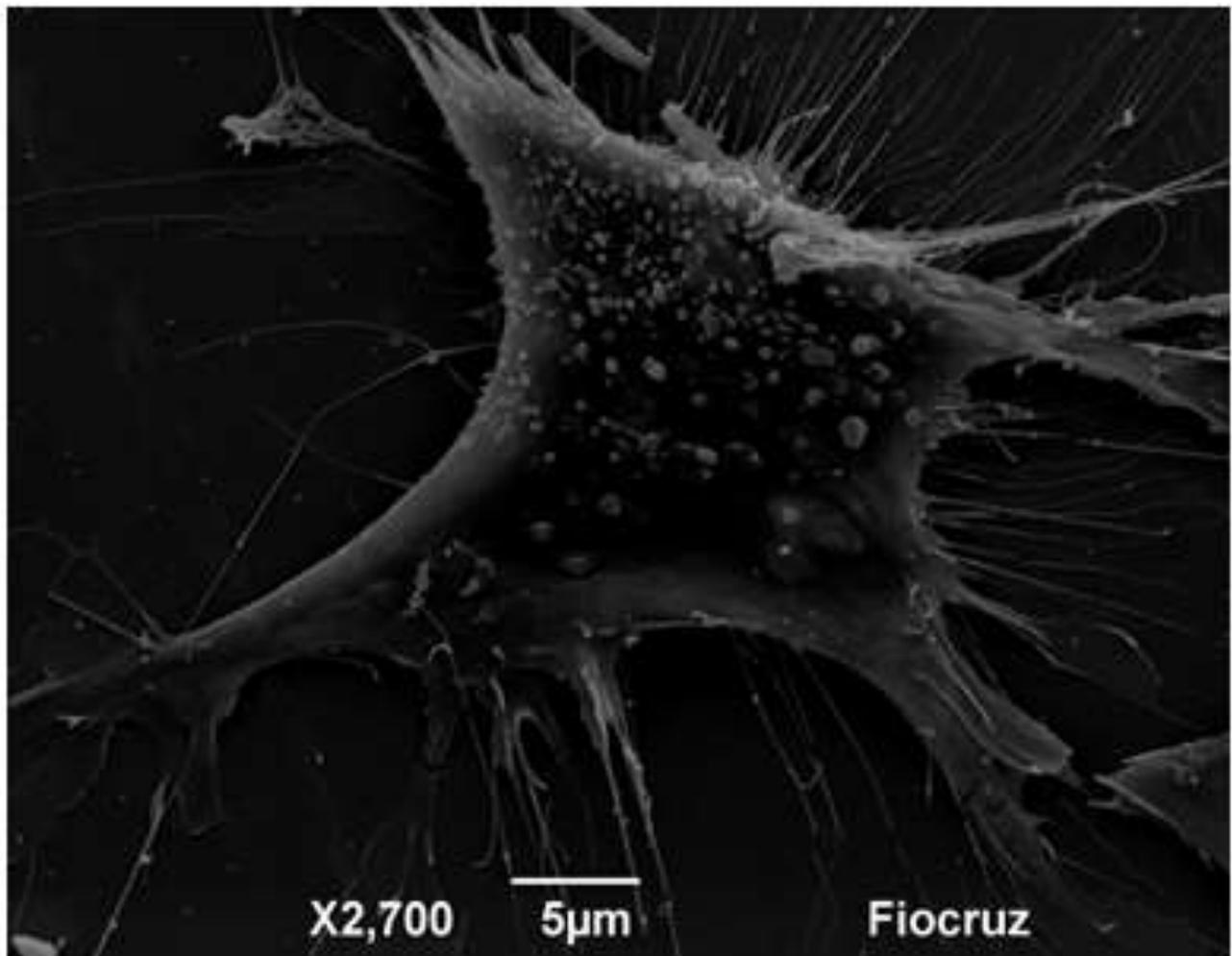
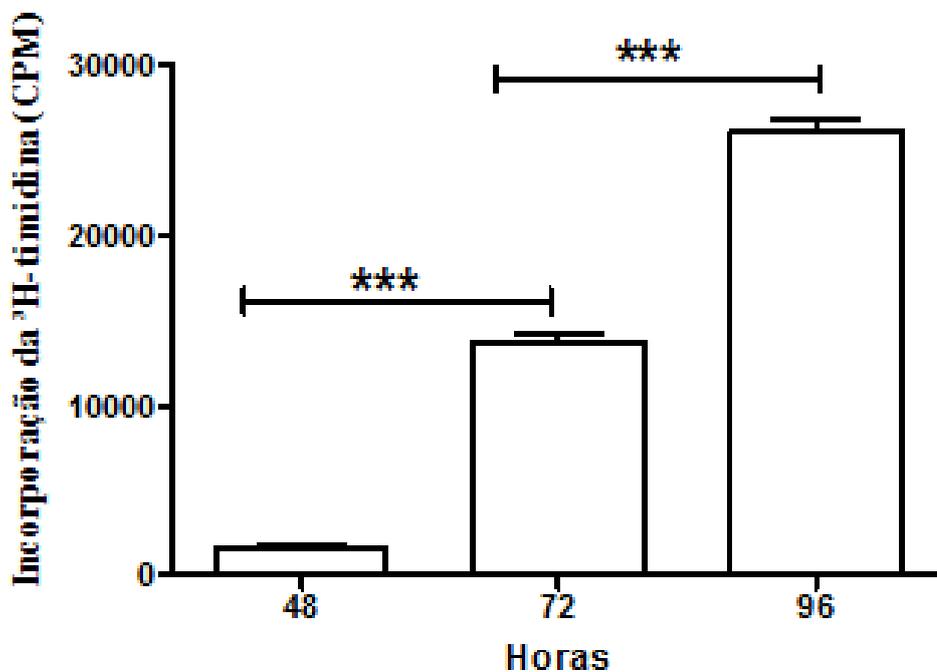


Figura 9 - Micrografia eletrônica de varredura de CTMs isoladas do tecido adiposo. Célula-tronco mesenquimal evidenciando a morfologia fibroblastóide e os detalhes dos prolongamentos citoplasmáticos de tamanhos variados.



Determinou-se a taxa de proliferação celular através da análise de incorporação da ^3H -timidina em culturas de CTMs. É possível notar que quanto maior o tempo de cultivo das células, maior é a taxa de incorporação da ^3H -timidina nas CTMs (Figura 10), demonstrando a capacidade de proliferação das células isoladas neste estudo, pela ocorrência de maior síntese de DNA em células cultivadas em intervalo de horas mais longo.

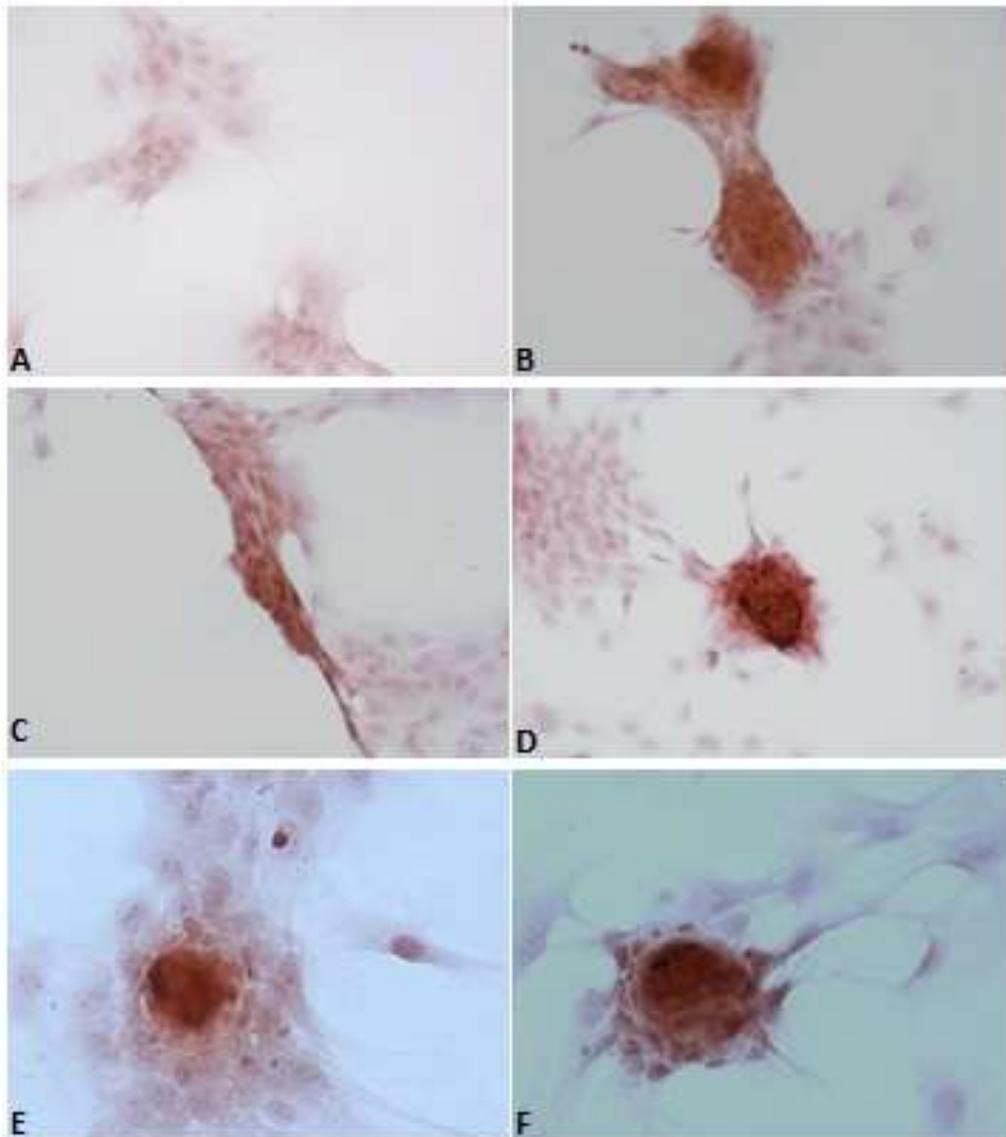
Figura 10 – Gráfico demonstrativo da taxa de incorporação de ^3H -timidina pelas CTMs. As CTMs foram cultivadas em meio DMEM com ^3H -timidina e incubadas durante tempos diferentes. Pode-se visualizar a taxa de proliferação nos respectivos tempos de incubação (48, 72 e 96 horas) pela quantidade de ^3H -timidina incorporada ao DNA celular (***) = $p < 0,05$).



A capacidade das CTM de se diferenciar em osteoblastos e adipócitos, ou seja a sua multipotencialidade foi demonstrada *in vitro* após a indução de células em 5ª passagem através dos métodos descritos. Após 15 dias em meios de indução pôde-se verificar o potencial de diferenciação das CTMs extraídas do tecido adiposo de ovinos.

A capacidade de diferenciação osteogênica foi confirmada através da coloração dos depósitos de cálcio pelo *Alizarin Red*, que pode ser observada em todos os poços com CTMs que foram cultivados com meio osteoindutor. O poço de CTMs utilizado como controle não foi marcado pelo *Alizarin Red* (Figura 11).

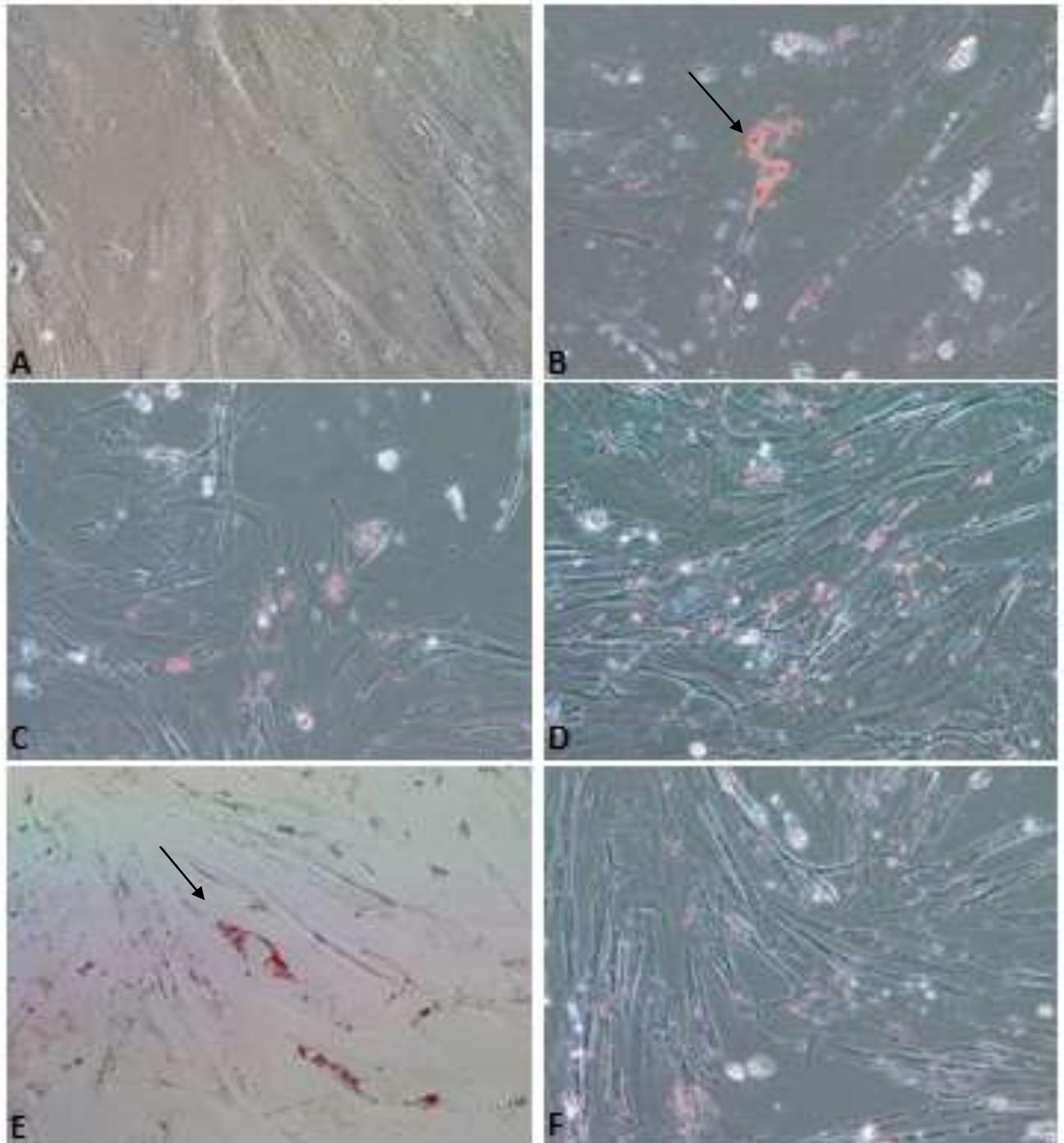
Figura 11 - Diferenciação osteogênica de CTM derivadas do tecido adiposo de ovino visualizada por microscopia óptica. (A) Células indiferenciadas no grupo controle cultivadas em meio DMEM. (B, C, D, E e F) Células diferenciadas cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica e coradas com Alizarin Red, evidenciando a mineralização da matriz extracelular (A, B, C e D em aumento de 200X / E e F em aumento de 400X).



Do mesmo modo, pôde-se confirmar a capacidade de diferenciação adipogênica de CTMs pela visualização de gotículas de lipídeo intracitoplasmáticas coradas em vermelho pelo *Oil Red* em todos os poço contendo CTMs que foram cultivadas em meios de indução adipogênica (Figura 12).

As propriedades mesenquimais das células isoladas foram avaliadas a partir do potencial de diferenciação *in vitro* destas células em linhagens celulares osteogênicas e adipogênica. A caracterização imunofenotípica tornou-se inviável pela ausência de kits com anticorpos específicos para espécie ovina.

Figura 12 - Diferenciação adipogênica de CTM derivadas do tecido adiposo de ovino visualizada por microscopia confocal. (A) Grupo Controle com células indiferenciadas cultivadas em meio DMEM. (B,C e D) Células diferenciadas cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e coradas pelo Oil Red, que evidencia as gotículas lipídicas intracelulares (setas pretas) em aumento de 200X.



7. DISCUSSÃO

O isolamento de CTMs a partir do tecido adiposo de ovinos obtido durante o fluxo do abate foi alcançado, sendo possível obter células-tronco com boa taxa de proliferação, livres de contaminação e com capacidade de diferenciação em outros tipos celulares. Ao realizar a coleta dos fragmentos do tecido adiposo no local de abate, deve-se tomar cuidados com relação à assepsia do material de coleta e do responsável pela mesma.

A área suja da sala de abate no abatedouro constitui-se um ambiente com elevado risco de contaminação para as amostras, pois nestas áreas realiza-se a sangria e a retirada da pele dos animais abatidos. Neste momento pode haver contato do tecido adiposo subcutâneo com pelos, fezes e/ou sangue. A lavagem dos fragmentos pode ter sido fundamental para que não houvesse a contaminação das amostras permitindo o estabelecimento da cultura primária.

A técnica utilizada para extração das CTMs de tecido adiposo de ovinos demonstrou-se simples, rápida e eficiente, pois, nesse estudo, foi possível realizar o isolamento das mesmas. Apesar da recuperação de pouca quantidade de células, que pôde ser visualizado pelo discreto *pellet* obtido após a centrifugação, as células recuperadas foram suficientes para formar a cultura primária das CTMs utilizadas neste experimento. O tempo entre a coleta e o isolamento dos fragmentos pode ser um fator a se considerar com relação a quantidade de células recuperadas, entretanto este quesito não foi avaliado neste estudo. Mesmo havendo um total de 10 horas entre a coleta e o isolamento das CTMs o objetivo deste trabalho pôde ser alcançado.

A região anatômica escolhida para a coleta do tecido adiposo é justificada pelo fácil acesso, rapidez na coleta e baixo risco de contaminação. Assim, não houve interferência da coleta no fluxo do abate dos animais, nem na qualidade da carne. Assim como neste estudo, Quimby et al. (2013) realizaram o isolamento de CTMs a partir do tecido adiposo subcutâneo na região abdominal ventral em gato, já Carvalho et al. (2013) isolaram CTMs do tecido adiposo da região inguinal de ratos.

Niada et al. (2013) demonstraram o isolamento e cultivo de CTMs obtidas do tecido adiposo de duas regiões anatômicas distintas em suínos, região subcutânea inter-escapular e tecido adiposo bucal. Células de ambas as origens apresentaram características de CTMs. Ren et al. (2012) realizaram o isolamento, expansão e

diferenciação de CTM derivadas do tecido adiposo da região inguinal de caprinos e do epidídimo de ratos, comprovando que as células isoladas eram de fato CTMs.

A cada manutenção das culturas, troca do meio e lavagem com solução salina, a cultura tornou-se, gradativamente, uma monocamada de células homogêneas, o que também foi demonstrado por Silva Filho et al. (2014). Apesar de alguns autores demonstrarem maior capacidade proliferativa quando o protocolo de extração das CTMs do tecido adiposo é realizado utilizando a colagenase, conforme relatado por Ginani et al. (2013). Neste estudo, o uso da tripsina na dissociação tecidual demonstrou-se bastante eficiente e possibilitou a extração de células capazes de gerar uma monocamada de células fibroblastóide aderentes ao plástico.

A *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) define que CTMs multipotentes de humanos devem expressar padrão imunofenotípico positivo para CD73, CD90 e CD95, e negativo para CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45 e HLA-DR (DOMINICI et al.,2006). Contudo, as CTMs isoladas neste trabalho, apresentaram crescimento em cultura e foram caracterizadas através de sua morfologia padrão e diferenciação em tecidos mesenquimais. A caracterização imunofenotípica das células tornou-se inviável pela falta de marcadores antigênicos específicos bem estabelecidos para estudos na espécie ovina.

Assim como para ovinos, não há marcadores antigênicos específicos bem definidos para caracterizar células progenitoras de equinos (MAMBELLI et al.,2009). Os autores verificaram a expressão de marcadores de CTMs a partir de kits humanos, entretanto os ensaios não demonstraram nenhuma reatividade. Os marcadores de superfície para caracterizar CTM são validados para camundongos e humanos, deste modo, os anticorpos nem sempre demonstram reatividade cruzada para outras espécies.

Os testes de diferenciação *in vitro* confirmaram as propriedades mesodermiais de CTMs derivadas do tecido adiposo ovino, que apresentaram capacidade relativamente rápida de mineralização da MEC, quando cultivadas em meios com propriedades osteocondutoras. As células também demonstraram boa capacidade de diferenciação em linhagens de células adiposas. Assim como demonstrado por Colosimo et al. (2013) ao induzirem a diferenciação em CTMs isoladas do líquido amniótico de ovinos.

Colosimo et al. (2013) demonstraram a capacidade de diferenciação osteogênica das CTMs, pelo método citoquímico evidenciando a deposição de cálcio na matriz extracelular através da coloração pelo *Alizarin Red*.

Em alguns protocolos registrados por Fadel et al. (2011), que promoveram o isolamento de células-tronco extraídas do tecido adiposo e do cordão umbilical, verificou-se que células obtidas a partir do tecido adiposo demonstraram resultados melhores quando comparadas às originárias do cordão umbilical de ovinos. Grzesiak et al. (2011) observaram um alto número de CTM isoladas a partir do tecido adiposo subcutâneo de carneiros, que se apresentaram com formato fusiforme, crescendo firmemente entre si e alcançando confluência total no sexto dia de cultura.

Mançanares et al. (2015) realizaram o cultivo de CTMs a partir do saco vitelínico de bovinos até a 11ª passagem. As células isoladas exibiam características morfológicas similares às observadas nesse estudo, como membranas citoplasmáticas finas e prolongamentos citoplasmáticos que variam em tamanho, além de variáveis proporções entre núcleo e citoplasma. As CTMs isoladas a partir do tecido adiposo de ovinos SPRD também apresentaram muitas projeções citoplasmáticas, que puderam ser visualizadas pela microscopia eletrônica por varredura, Sendo essas, provavelmente, responsáveis pela aderência das células à superfície plástica, como também pela ligação entre as células, promovendo a formação da cultura em monocamada confluenta.

Conforme Yokomizo (2011), o tecido adiposo representa uma fonte de CT que possuem maior capacidade proliferativa do que as células derivadas da medula óssea. Esta característica pode ser intrínseca ou um resultado da alta densidade de células na população inicial, o que possibilita recuperar um número significativo de células mesenquimais.

CTMs derivadas do tecido adiposo de cães demonstraram potencial osteogênico e adipogênico após 3 semanas de cultivo em meios de indução *in vitro*. (RYU et al.,2009). Já neste estudo, ambas as induções, osteogênica e adipogênica, foram alcançadas após 15 dias de cultivo das CTMs em meios de cultura indutores.

Mambelli et al. (2009) realizaram isolamento e expansão de CTMs derivados do tecido adiposo de equinos antes e depois da criopreservação. E demonstraram potencial de diferenciação em linhagens celulares mesodermiais em ambos os tratamentos. Os autores relatam um grande número de vacúolos lipídicos após o sétimo dia de cultivo das células em meio de indução adipogênico.

Apesar das CTMs terem sido diferenciadas em células de outras linhagens mesodermis, após a indução do cultivo *in vitro*, o que definirá o padrão de potencialidade será o comportamento dessas células após o transplante em experimentos *in vivo*.

8. CONCLUSÕES

Pôde-se obter células-tronco de tecido adiposo subcutâneo de ovinos, e estas expressam características morfológicas fibroblastóides, aderência ao plástico em cultura monocamada confluyente e potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogênica e adipogênica. Tal como, as propriedades apresentadas em estudos realizados em ovinos e em outras espécies.

9. PERSPECTIVAS

- Estabelecer um banco de células-tronco isoladas de animais da região para utilização em novos estudos na medicina regenerativa;
- Viabilizar a caracterização imunofenotípica das células isoladas;
- Testar o potencial de diferenciação em lesões de modelos animais;
- Difundir conhecimento e capacitar profissionais nas áreas de criopreservação, extração, cultivo in vitro de células-tronco e terapia celular;
- Promover convergência de pesquisadores e formação de grupos de pesquisa nessa área do conhecimento.

REFERÊNCIAS

- AMORIN, B. et al. **Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas**. Rev. HCPA, v. 32, n.1, p.71-81, 2012.
- ANVERSA, P; SUSSMAN, M. A.; BOLLI, R. **Molecular genetic advances in cardiovascular medicine: focus on the myocyte**. Circulation, v. 109, n. 23, p.2832-2838, 2004.
- BAGLEY, R.G. et al. **Human mesenchymal stem cells from boné marrow express tumor endothelial and stromal markers**. Int. J. Oncol. v. 34,p.619-627, 2009.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S. **Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy**. Journal of Cellular and Molecular Medicine, v.8, p.301-316, 2004.
- BARCO, R. et al. **Uso de células troncales derivadas de lipoaspirado en un modelo experimental animal de rotura de manguito rotador**. Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol. v. 59, n. 1, p.3-8, 2015.
- BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization**. Int. J. Biochem. Cell. Biol. v.36,n.4, p.568-584, 2004.
- BONAB, M.M. et al. **Aging of mesenchymal stem cell in vitro**. BMC Cell Biology, 7: 14, 2006
- BOULANGER, L.M.; SHATZ, C.J. **Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease**. Nat. Neurosci. v. 5, p.521-531, 2004.
- BRAVO, M. O. et al. **Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco do tecido adiposo de equinos**. ARS Veterinaria, v.28, n.2, p.66-74, 2012.
- BRUCE, A. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 844p.
- BRUGGER, W.; et al. **Ex vivo manipulation of hematopoietic stem and progenitor cells**. Seminars in Hematology, v. 37, n. 2, p.42-49, 2000.
- BUNNELL, B. A. et al. **Adipose-derived stem cell: Isolation, expansion and differentiation**. Methods, v.45, n.2, p.115-120, 2008.
- BYDLOWSKI, S. P. et al. **Características biológicas das células-tronco mesenquimais**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. v.31, n.1, p.25-35, 2009.
- CALLONI, R. et al. **Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms**. Cytotherapy, v.16, p.3-16, 2014.

- CAMPAGNOLI, C. et al. **Identification of mesenchymal stem/ progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow.** *Blood*, v.98, n.8, p.2396-2402, 2001.
- CAPLAN, A. I. **Mesenchymal stem cells.** *J. Orthop. Res.* v.9, p.641-50, 1991.
- CAPLAN, A.I. **Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.** *J. Cell Physiol.* v.213,p.341-347, 2007.
- CARREL, L. A.; BURROWS, M. T. **Cultivation of adult tissues and organs outside the body.** *JAMA*, v.55, n.16, p.1937-1381, 1910.
- CARVALHO, P. H. et al. **Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo em Cardiomiócitos.** *Arq. Bras. Cardiol.* v.100, n.1, p.82-89, 2013.
- CAVALCANTE, A. C. R. et al. **Produção de ovinos e caprinos de corte m pastos cultivados sob anejo rotacionado.** Circular Técnica 31. Embrapa Caprinos. 16p., 2005.
- CODEVASF. COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DO PARNAÍBA. **Cenários prospectivos para os vales do São Francisco e do Parnaíba 2009-2028.** Fundação Getúlio Vargas. Brasília, 2010. 258p.
- COLOSIMO, A. et al. **Prolonged *in vitro* expansion partially affects phenotypic features and osteogenic potential of ovine amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells.** *Cytotherapy*, v.15, p.930-950, 2013.
- COPLAND, I. et al. **CD34 expression on murine marrow derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization.** *Experimental Hematology*, v. 36, p.93-103, 2008.
- CORREIA, R. C. et al. **A região semiárida brasileira.** In: VOLTOLINI, T. V. (Ed.). *Produção de Caprinos Ovinos no Semiárido.* Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011. Cap. 1, p. 21-48.
- DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO NETO, N.M. **Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual.** *Ciênc. vet. tróp.*, v. 11, n.1, p.167-169, 2008.
- DOMINICI, M.; et al. **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.
- DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. **The end of the beginning for pluripotent stem cells.** *Nature*, v.414, p.92-97, 2001.
- FADEL, L. et al. **Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep.** *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 26, n. 4, p.267-273, 2011.

FORTIER, L. A.; TRAVIS, A. J. **Stem cells in veterinary medicine**. Stem Cell Research & Therapy, v.2, n.9, p.1-6, 2011.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K. ; LALYKINA, K.S. **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells**. Cell Tissue Kinet, v. 3, p.393-403, 1970.

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

GINANI, F.; SOARES, D. M.; BARBOZA, C. A. G. **Rendimento de células mesenquimais do tecido adiposo submetidas a diferentes protocolos de extração**. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. v.17, n.1, p. 65-70, 2013.

GREGOIRE, F.M.; SMAS, C.M. ; SUL, H.S. **Understanding adipocyte differentiation**. Physiol. Rev. v. 78, p. 783–809, 1998.

GRITTI, A.; VESCOVI, A. L.; GALLI, R. **Adult neural stem cells plasticity and developmental potential**. J. Physiol., v.96, n.1/2, p.81-89, 2002.

GRZESIAK, J.; et al. **Isolation and morphological characterisation of ovine adipose-derived mesenchymal stem cells in culture**. International Journal of Stem Cells, v. 4, n. 2, p.99-104, 2011.

HAYNESWORTH, S.E. et al. **Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow**. Bone, v.13, p. 81–88, 1992.

HEIDARI, B. et al. **Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue**. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, v. 5, n. 2, p.104-117, 2013.

HELMY, K. Y. et al. **Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise**. Ther Delive. v.1, p. 693-705, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal 2013**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014.

JAVAZON, E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. **Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging**. Exp. Hematol. v.32, p. 414-425, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 302p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. 364p. p. 20-40.

KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R. S. **Mesenchymal stromal cells biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.** *Arthritis Research & Therapy*, v.9, n.1, p. 1-10, 2007.

KONO, S. et al. **Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells.** *Vet. J.* v. 199, n.1, p. 88-96, 2014.

LEON-QUINTO, T. et al. **Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells.** *Cryobiology*, v.62, p.145–151, 2011.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. **Biomechanics of tendon injury and repair.** *Journal of Biomechanics*, v. 37, p.865–877, 2004.

LIU, Z.J.; ZHUGE, O.; VELAZQUEZ, O.C. **Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells.** *Journal of Cellular Biochemistry*.v. 6, p. 984–991, 2009.

LYAHYAI, J. ET AL. **Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood.** *BMC Veterinary Research*, V.169, N.8, 2012.

MACEY, M. G. **Flow cytometry: Principles and applications.** 1. Ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2007. 290p.

MALAVAR-ORTEGA, L.F.et al. **The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates.** *Theriogenology*, v.78, p.1749-1762, 2012.

MALEKI, M.; et al. **Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells.** *International Journal of Stem Cells*. v.7, n.2, 2014.

MAMBELLI, L. I. et al. **Characterization of equine adipose tissue–derived progenitor cells before and after cryopreservation.** *Tissue Engineering: Part C*. v.15,n.1, p.87-94, 2009.

MANÇANARES, C.A.F. et al. **Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the yolk sacs of bovine embryos.** *Theriogenology*, v.84, p.887–898, 2015.

MARQUES, M. B. **O que é célula-tronco?** 1ª edição: editora Basiliense. São Paulo, 2006. 85p.

MARQUEZ-CURTIS, L. A. et al. **Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects.** *Cryobiology*, v.71, n.2, p.181-197, 2015.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.;NARDI, N. B. **Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications .** *Stem Cells and Development*, v.24, n.7,p. 803-813, 2015.

MEIRELLES, L. S.; et al. **Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells**. Cytokine & Growth Factor Reviews, v. 20, p. 419-427, 2009.

MEMON, I.A. et al. **Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy**. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. v.130,p. 646–653, 2005.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. **Células-tronco mesenquimais**. Cienc. Rural, v. 40, n.1, p.238-245, 2010.

MORRISON, S. J. ; SPRADLING, A. C. **Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life**. Cell, v.132, p.598–611, 2008.

MROZIK, K.M. et al. **Proteomic characterization of mesenchymal stem cell-like populations derived from ovine periodontal ligament, dental pulp, and bone marrow: Analysis of differentially expressed proteins**. Stem Cells and Development, v.19, p.1485–1499, 2010.

MURPHY, J. M. et al. **Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis** Arthritis & Rheumatism, v. 48, n.12, p 3464–3474, 2003.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. **Mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion and characterization**. Handbook of experimental pharmacology, v. 174, p. 249-282, 2006.

NERY, A.A. et al. **Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications**. Cytometry A, v.83, p. 48-61, 2013.

NEUPANE, M. et al. **Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells**. Tissue Eng. Part A. v. 14, n.6, p.1007-1015,2008.

NIADA, S. et al. **Porcine adipose-derived stem cells from buccal fat pad and subcutaneous adipose tissue for future preclinical studies in oral surgery**. Stem Cell Research & Therapy, v.4,n.6, p. 2-11, 2013.

NIEMEYER, P. et al. **Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma**. Biomaterials, v.31, p.3572–3579, 2010.

PACHLER, C. et al. **Subcutaneous adipose tissue exerts proinflammatory cytokines after minimal trauma in humans**. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. v.293, p.690–696,2007.

PRENTICE, D. A.; TARNE, G. **Treating diseases with adult stem cells**. Science. v.5810, p. 15-328, 2007.

PITTENGER, M.F. et al. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells**. Science, v. 284,p.143-147, 1999.

- QU, C.Q. et al. **Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells.** *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, v.43, n.2, p. 95-100, 2007.
- QUIMBY, J. M. et al. **Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies.** *Stem Cell Research & Therapy*, v.48, n.4, p.2-12, 2013.
- RAINLY, D.M. et al. **Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice.** *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.89, n.1, p.139-147, 2007.
- REN, Y. et al. **Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells.** *Research in Veterinary Science*, v. 93, p.404-411, 2012.
- ROBBINS, S.; COTRAN, R. **Patologia - Bases patológicas das doenças.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.
- RUIZ-IBÁN, M. et al. **The effect of the addition of adipose-derived mesenchymal stem cells to a meniscal repair in the avascular zone: An experimental study in rabbits.** *Arthroscopy*, v.27, p.1688-1696, 2011.
- RYU, H.H. et al. **Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogeneic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury.** *J. Vet. Sci.* v.10, n.4, p.273-284, 2009.
- SANDERS, R. C. et al. **Stem cell research.** *Paediatric respiratory reviews*, v. 7, n. 2, p. 135-140, 2006.
- SANTOS, F. R.; SANTOS, M. J. C. **Sistema silvipastoril com ovinos mantidos em pastejo rotacionado no semi-árido sergipano.** *Agropecuária Científica no Semiárido*, Patos-PB, v.06, n.2, p. 28-31, 2010.
- SARTORI, C. et al. **Ovine-induced pluripotent stem cells can contribute to chimeric lambs.** *Cellular Reprogramming*, v.14, p.8-19, 2012.
- SCHOFIELD, R. **The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell.** *Blood Cells*. v.4, p.7-25, 1978.
- SHEERLINCK, J. P. et al. **Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines.** *Trends Biotechnol.*, v.26, p.259-266, 2008.
- SILVA FILHO, O. F. et al. **Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil.** *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.29, n.8, p.478-484, 2014.
- SIMPLÍCIO, A. A. **A caprino-ovinocultura na visão do agronegócio.** *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária*. v.7, n.24, p. 15-18, 2001.

SOUZA, A. L. ; ARRUDA, I. J. ; RONDIA, D. **Função, controle transcricional e atividade endócrina do tecido adiposo nos mamíferos.** ACSA Agropecuária Científica no Semi-Árido, v.5, p.1-15, 2009.

STREM, B.M.,et al. **Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells.** The Keio Journal of Medicine, v. 54, p.132-141, 2005.

TAKAHASHI, K. et al. **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** Cell. v.131, p. 861–872, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** Cell, v.126, p.663–676, 2006.

THEISE, N.D.; KRAUSE, D.S. **Toward a new paradigm of cell plasticity.** Leukemia, v.16, p. 542-548, 2002.

THOMSON, J. A.; et al. **Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts.** Science. v.282, 1145-7, 1998.

VANCE, D. E.; VANCE, J.E. **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.**4th edn. Elsevier Science, 2002. pp. 264-289. 631p.

VIANA, J. G. A.; WAQUIL, P. D.; SPOHR, G. **Evolução histórica da ovinocultura no rio grande do sul: comportamento do rebanho ovino e produção de lã de 1980 a 2007.** Revista Extensão Rural- UFSM, Ano XVII, n. 20,2010.

VOOG, J., D'ALTERIO, C., JONES, D. L. **Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the Drosophila testis.** *Nature*, v.454, p.1132–1136, 2008)

WATT, F. M.; DRISKELL, R.R. **The therapeutic potential of stem cells.** Phil. Trans. R. Soc. B. v. 365, p.155-163, 2010.

WHITWORTH, D. J. ; BANKS, T. A. **Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature?** The Veterinary Journal. V.202, n.3, p.416-424, 2004.

WU, Y. et al. **Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review.** Wound Repair Regen; v.15, p.18-26, 2007.

WURMSER, A.E.; PALMER, T.D.; GAGE, F.H. **Cellular interactions in the stem cell niche.** Science, v.304, p.1253-5, 2004.

YAMANAKA, S. **Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells.** Cell Stem Cell. v.1, p.39–49, 2007.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. **Human adipose-derived stem cells: current and clinical perspectives.** An. Bras. Dermatol.,v. 85, n. 5, p.647-656, 2010.

- YOKOMIZO, V.M.F. et al. **Células-tronco derivadas de tecido adiposo: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em dermatologia.** Surg. Cosmet. Dermatol., v.3, n.1,p.55-59, 2011.
- YU, J. et al. **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** Science, v.318, p.1917-20, 2007.
- YUSPA, S. H. **The pathogenesis of squamous cell cancer : lessons learned from studies of skin carcinogenesis.** Journal of Dermatological Science., v.17,p.1-7, 1998.
- ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina.** São Paulo: Atheneu, 2006. 268p.
- ZECH, N, H. **Adult stem cell manipulation and possible clinical perspectives.** J. Reproduktionsmed. Endokrinol. v.1, n.2, p.91-99, 2004.
- ZHANG, W. et al. **Hard tissue formation in a porous há/tcp ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and boné marrow.** Tissue Enginering Part A, v. 14, n.2,p.285-94, 2008.
- ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** Cell, v.132, p.645–660, 2008.
- ZHU, J. **Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production.** Biotechnology Advances, v.30, p.1158-1170, 2012.
- ZUK ,P.A. et al. **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** Tissue Eng.v.7, n.2, p.211-28, 2001.
- ZUK, P. A. et al. **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** Molecular biology of the cell, v. 13, p. 4279-4295, 2002.
- ZUTTON, M. S. S. R.; et al. **Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica.** Rev. Bras. Cardiol. Invasiva. V.21, n.3, p.281-7,2013.