



TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EXTRAÍDAS DE TECIDO ADIPOSEO

Jéssica Cristina Stefanutto¹; Marta Maria Dal Molin²; Isabele Picada Emanuelli³

RESUMO: As células tronco têm a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares para formar ou regenerar tecidos lesados. Em pequena quantidade podem ser encontradas em vários tecidos do indivíduo adulto, seja ele animal ou humano. Um dos principais problemas da utilização de células tronco adultas (CTAs) nas terapias celulares é a baixa presença destas células nos tecidos, bem como a dificuldade de obtenção e isolamento. Com base nestas evidências, o objetivo deste projeto será validar uma metodologia para o isolamento de CTMs de tecidos adiposos que seja eficaz quanto à quantidade e qualidade celular obtida. Para tanto, a prática será realizada no laboratório de Biotecnologia celular do UNICESUMAR e as amostras serão obtidas de animais - espécies domésticas canina e felina - pacientes do hospital veterinário do UNICESUMAR, que passarão por procedimentos cirúrgicos de rotina. A coleta da amostra será realizada durante os procedimentos cirúrgicos, com assepsia local de rotina. Os resíduos cirúrgicos de tecido adiposo serão acondicionados em tubos Falcon contendo uma solução tampão e encaminhados ao laboratório em condições estéreis, onde dentro de um fluxo laminar, será triturado, digerido com enzimas, centrifugado e lavado para o isolamento celular. Em seguida serão inoculadas em meios de cultivo enriquecidos e incubadas na estufa de CO₂ para o crescimento celular. Ao final será utilizado microscópio invertido para realizar a contagem e avaliar a morfologia destas células. Com base na revisão bibliográfica os diferentes métodos serão avaliados para padronizar uma metodologia eficaz na obtenção das CTMs isoladas do tecido adiposo.

PALAVRAS-CHAVE: Células tronco mesenquimais; Isolamento celular; Tecido adiposo; Terapia celular.

1. INTRODUÇÃO:

As células tronco (CTs) são células indiferenciadas e com grande potencial no campo da medicina regenerativa visando proporcionar tratamentos terapêuticos para doenças e/ou lesões, que medicamentos convencionais e até mesmo novas terapias, como drogas biológicas, não podem efetivamente ter sucesso de cura (FODOR, 2003).

Basicamente as CTs podem ser classificadas como células tronco embrionárias (CTEs), encontradas em embriões em estágios iniciais, e células tronco estaminais adultas (CTAs), encontradas em vários tecidos. Esta última tem o benefício de poder ser isolada do próprio paciente, além de ser mais segura quanto a riscos carcinogênicos (DEL CARLO et al., 2009).

As CTAs são divididas em duas linhagens: as células tronco hematopoiéticas (CTHs) e as células tronco mesenquimais (CTMs) (ZHANG et al., 2012). No organismo humano e animal, muitas doenças resultam em perda de células especializadas levando à disfunção

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). Jessica_cristinna@hotmail.com

² Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Martinha_dalmolin@hotmail.com

³ Orientadora, Professora Doutora do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR. isabele@cesumar.br

de órgãos e sistemas. Desta forma, as CTAs presentes nos diferentes tecidos possuem um papel fisiológico regenerativo durante estas lesões ou injúrias (FODOR, 2003).

Por muitos anos, as CTAs mais estudadas, como fonte tanto de células tronco hematopoiéticas (CTHs), quanto de células tronco mesenquimais (CTMs), foram as da medula óssea. Recentemente, as CTMs foram encontradas em vários outros tecidos. Além da medula óssea e sangue, estas células foram identificadas nos tecidos de indivíduos adultos (tecido adiposo, pericitos, pele, trabéculas ósseas, periósteo, dente decidual, cartilagem articular, membrana sinovial, fluido sinovial, músculo esquelético), e nos tecidos fetais (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo, pulmão) (DELO et al., 2006; MIURA et al., 2006; BYDLOWSKI et al., 2009). Por conta dessa plasticidade celular, são crescentes os investimentos em pesquisas, tanto na iniciativa pública como na privada.

Um ponto crucial para as aplicações terapêuticas das CTMs é o desenvolvimento de biotécnicas mais eficientes para o isolamento, cultura, e diferenciação *in vitro*, mediante metodologias que otimizem tanto a quantidade quanto a qualidade das células obtidas. Sendo assim, vem crescendo o interesse na manipulação de CTMs, pois estas diferem das CTHs pela capacidade *in vitro* de aderência em tubos e frascos de cultura, e por serem mais facilmente separadas dos demais tipos celulares (OLIVEIRA, 2009).

Um das linhagens de CTMs de maior interesse na atualidade são as encontradas no tecido adiposo, as quais são obtidas por um procedimento simples e pouco invasivo. Em humanos, uma das técnicas utilizadas para sua obtenção ocorre por meio de lipoaspiração. Um experimento realizado em humanos, que utilizou o tecido adiposo obtido por lipoaspiração, demonstrou que a quantidade de células isolada de uma mesma amostra de tecido varia conforme a metodologia de isolamento utilizada (YARAK e OKAMOTO, 2010).

A fim de avaliar protocolos de isolamento de CTMs do tecido adiposo, o modelo animal é uma alternativa simples e eficiente para testes de procedimentos. Para tanto, a utilização de tecido adiposo de resíduos cirúrgicos, é uma alternativa importante, pois não é necessário utilizar animais exclusivos para pesquisa, e sim animais da rotina hospitalar. Com isso, evitamos a utilização de cobaias animais ou de seres humanos, não esbarrando em questões de bioética humana e animal.

É importante ressaltarmos que um dos principais problemas da utilização de CTAs nas terapias celulares, é a baixa presença destas nos tecidos, bem como a dificuldade de obtenção e isolamento, o que muitas vezes inviabiliza sua utilização terapêutica.

Com base nas evidências apresentadas, formulamos a hipótese de que uma metodologia mais adequada, para isolamento de CTMs do tecido adiposo, poderia maximizar a sua utilização terapêutica em tratamentos clínicos mediante o aumento da qualidade e quantidade de células isoladas. Diante de tantos benefícios, o isolamento dessas células através de métodos eficazes é de grande interesse aos centros de pesquisas, pois além de seu benefício terapêutico, sua obtenção é minimamente invasiva e sua manipulação em laboratórios é fácil e prático.

O presente estudo tem como objetivo validar uma metodologia para o isolamento de CTMs de tecido adiposo que seja eficaz quanto à quantidade e qualidade celular obtida, com base nos dados da literatura científica sobre o assunto e as técnicas existentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Será realizada uma vasta pesquisa bibliográfica na literatura científica da área visando selecionar técnicas e protocolos de isolamento celular. Em um segundo momento

será realizada a parte experimental para testar os protocolos (previamente selecionados) objetivando o isolamento de CTMs em amostras de tecido adiposo.

No período experimental serão coletadas amostras de tecido adiposo de animais que passarem por procedimentos cirúrgicos no Hospital Veterinário do Unicesumar (HV), a fim de extrair CTMs. Essas amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Celular. O material coletado será acondicionado junto com antibióticos e transportado em ambiente refrigerado até a unidade de processamento, e sob fluxo laminar, será realizado o isolamento dessas células em meio de cultivo estéril. As amostras de tecido irão passar por um processo de digestão enzimática, centrifugação e lavagem. Posteriormente, em microscópio invertido, serão realizadas as avaliações das amostras quanto à quantidade de células obtidas e qualidade morfológica.

Finalizada a etapa de teste de protocolos de isolamento, será realizada análise estatística dos resultados para escolha da metodologia de isolamento mais eficiente.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Com o presente estudo busca-se selecionar técnicas eficazes no isolamento de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo que tenham qualidade e quantidade suficientes para uma possível terapia médica, e assim validar uma metodologia para o isolamento destas, que seja eficaz quanto à quantidade e qualidade celular obtida.

4. REFERÊNCIAS

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.31 supl.1 São Paulo May 2009 Epub June 05, 2009.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N.M. Avanços no estudo de - células-tronco no Brasil e suas implicações. Revista Ceres. 2009;56(4): 446-450,

DELO, D.M.; DE COPPI, P.; BARTSCH, G. Jr.; ATALA, A. Amniotic fluid and placental stem cells. Methods Enzymol. 2006; 419:426-38.

FODOR, W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:102

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L.W.; ROBEY, P.G.; et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(10):5807-12.

OLIVEIRA, B. J. N. A. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais. Revisão de literatura. 2009. 31 f. (programa de pós-graduação em ciência animal da escola veterinária) – Universidade federal de Goiás.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. An Bras Dermatol. 2010; 85(5):647-56.

ZHANG, Y.; KHANG, D.; DELLING, J.; TOBIASCH, E. Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem cells. The Scientific World Journal Volume 2012, Article ID 793823, 14 pages doi: 10.1100/2012/793823.

Anais Eletrônico

VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar
Editora CESUMAR
Maringá – Paraná – Brasil