



## TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EXTRAÍDAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA

*Nathan Gomes Modesto<sup>1</sup>; Isabela Cateli<sup>2</sup>; Diogo César Vieira Ferreira<sup>3</sup>; Ariely Conrado de Lima<sup>4</sup>; Isabele Picada Emanuelli<sup>5</sup>*

**RESUMO:** As células-tronco tem a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares para formar ou regenerar tecidos lesados. 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 da membrana amniótica que seja eficaz quanto à quantidade e qualidade celular obtida. Para tanto, a prática será realizada no laboratório de Biotecnologia celular da UniCesumar e as amostras serão obtidas de animais - espécies domésticas canina e felina - pacientes do hospital veterinário da UniCesumar - que passarão por procedimentos de cirurgia cesariana. A coleta da amostra será realizada durante os procedimentos cirúrgicos, com assepsia local de rotina. A membrana amniótica será separada dos resíduos cirúrgicos dos tecidos extra-embrionários. Em seguida, o material será acondicionado em tubo contendo uma solução tampão e encaminhado ao laboratório em condições estéreis. No laboratório, a amostra será processada em fluxo laminar passando pelos seguintes processos: trituração, digestão enzimática, centrifugação, lavagem e isolamento celular. Após estes processos, as células isoladas serão avaliadas quanto a sua qualidade morfológica e quantidade celular. Os resultados obtidos nas avaliações serão analisados estatisticamente usando modelos lineares generalizados. Com base na análise dos dados, será escolhida a metodologia mais adequada e eficiente na obtenção das CTMs. Finalmente será redigido um artigo científico e apresentado os resultados em congresso científico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células-tronco adultas; isolamento celular; membrana amniótica; terapia celular.

### 1 INTRODUÇÃO

Na última década surgiu um grande interesse no estudo das células-tronco para a medicina terapêutica, devido ao seu elevado potencial na regeneração de tecidos e órgãos lesados. As células-tronco (CT) podem ser classificadas quanto ao seu grau de potencialidade como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, e quanto a sua origem como somáticas ou embrionárias (ZAGO; COVAS, 2006). As implicações éticas envolvidas com o uso terapêutico das CTs embrionárias levaram a busca de fontes alternativas de células-tronco adultas, dentre estas as CT hematopoiéticas e CT

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). [nathangomes@hotmail.com](mailto:nathangomes@hotmail.com)

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. [isabela\\_cateli@hotmail.com](mailto:isabela_cateli@hotmail.com)

<sup>3</sup> Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. [diogo\\_cesar\\_vieira@hotmail.com](mailto:diogo_cesar_vieira@hotmail.com)

<sup>4</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. [ari.delima@hotmail.com](mailto:ari.delima@hotmail.com)

<sup>5</sup> Orientadora, Professora Doutora do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR. [isabele@cesumar.br](mailto:isabele@cesumar.br)

mesenquimais. A fonte mais utilizada de células-tronco mesenquimais (CTM) é a medula óssea, no entanto, como há uma redução em sua quantidade e capacidade de diferenciação com o passar dos anos, seu potencial terapêutico também diminui com o tempo. Devido a estas limitações, outras fontes de células-tronco mesenquimais foram identificadas, sendo que as células derivadas dos anexos embrionários têm recebido grande destaque.

A membrana amniótica demonstra propriedades anti-inflamatórias, antibióticas e de proteção quando colocadas sobre lesões teciduais. Estas propriedades, combinadas com a ausência ou baixa imunogenicidade, levaram ao uso clínico da membrana amniótica como curativo para queimaduras de pele, úlceras nos membros inferiores e diversas lesões oftálmicas. No entanto, nos últimos anos um novo foco de pesquisa quanto às células derivadas da membrana amniótica surgiu: sua utilização na terapia celular e medicina regenerativa em transplantes alogênicos ou xenogênicos (PAROLINI; CARUSO, 2011).

Devido a estas limitações outras fontes de células-tronco mesenquimais foram identificadas (MINGUEL et al., 2001) sendo que as células derivadas dos anexos fetais tem recebido bastante destaque por se apresentarem como uma alternativa não invasiva, utilizando-se de tecidos que normamente seriam descartados em práticas cirúrgicas de rotina, com grande possibilidade de coleta ao nascimento para a formação de bancos de armazenamento para uso posterior (TSAI et al., 2004; CREMONESI et al., 2011).

Igualmente, as células-tronco mesenquimais derivadas dos anexos embrionários como a membrana amniótica, preservam características dos tecidos embrionários de que se originam e muitos estudos estão indicando que estas células exibem características de células embrionárias como a expressão do marcador Oct-4, grande capacidade proliferativa sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade e ainda capacidade de diferenciação em diversos tecidos, inclusive extra mesenquimais (MIKI et al., 2005; CREMONESI et al., 2011). Fauza (2004) descreveu as membranas placentárias e o líquido amniótico como únicas fontes que contém diferentes populações de células-tronco, apresentando subpopulações mesenquimais, hematopoiéticas, trofoblásticas, e possivelmente células-tronco embrionárias ainda mais primitivas e indiferenciadas.

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 aperfeiçoem tanto à quantidade quanto a qualidade das células obtidas (BYDLOWSKI et al., 2009).

A fim de avaliar protocolos de isolamento de CTMs da membrana amniótica, o modelo animal é uma alternativa simples e eficiente para testes de procedimentos. Para tanto, a utilização de membrana amniótica 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 esbarramos 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 células nos tecidos, bem como a dificuldade de obtenção e isolamento, o que muitas vezes inviabiliza sua utilização terapêutica (BYDLOWSKI et al., 2009). Com base nas evidências apresentadas, formulamos a hipótese de que uma metodologia mais adequada, para isolamento de CTMs da membrana amniótica, poderia maximizar a sua utilização terapêutica em tratamentos clínicos mediante o aumento da eficiência da qualidade e da quantidade das células isoladas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente será realizada uma vasta pesquisa bibliográfica na literatura científica da área visando selecionar técnicas e protocolos de isolamento celular. Em um segundo momento será realizado a parte experimental para testar os protocolos (previamente selecionados) objetivando o isolamento de CTMs em amostras de membrana amniótica.

No período experimental serão coletadas amostras da membrana amniótica de animais que passarem por procedimentos cirúrgicos no Hospital Veterinário - UniCesumar, a fim de extrair CTMs. Essas amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Celular. O material coletado será acondicionado junto com antibióticos e transportados 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 quanto à qualidade morfológica.

Posteriormente será realizada análise estatística dos resultados usando modelos lineares generalizados. Com base na análise dos dados, será escolhida a metodologia mais adequada e eficiente na obtenção das CTMs isoladas da membrana amniótica. Finalmente será redigido um artigo científico e apresentado os resultados em congresso científico.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo busca a reprodução e validação de técnicas eficazes no isolamento de células-tronco mesenquimais extraídas de membrana amniótica que tenham qualidade e quantidade suficientes para uma possível terapia médica.

De acordo com estudos recentes, foi realizado o isolamento de células-tronco da membrana amniótica de humanos através de um procedimento padrão que objetivava a obtenção dessas células com elevada pureza e atividade, uma identificação simples e clara dos indicadores e uma abordagem de cultura in vitro apropriada, com êxito (SHUANG-ZHI; PING; XI-NING, 2010). Essas células expressaram marcadores de superfície característicos de células mesenquimais como CD44, CD90 e vimentina, não expressando CD45. Outros estudos demonstraram que ambas as células mesenquimais da membrana amniótica humana apresentaram potencial de diferenciação na maioria das linhagens mesodermiais, proporcionando seu uso em terapia celular e medicina regenerativa (DIAZ-PRADO et al., 2011).

## 4 CONCLUSÃO

Espera-se ao término deste projeto protocolar uma metodologia de isolamento celular de células tronco adultas da membrana amniótica para estabelecer o início desta linha de pesquisa no laboratório de Biotecnologia Celular e Reprodutiva localizado na Fazenda da UniCesumar.

## 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.
- CREMONESI F, CORRADETI B, LANGE CA. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. **Theriogenology.** 2011; 75:1400-15.
- DÍAZ-PRADO S, MUIÑOS-LÓPEZ E, HERMIDA-GOMEZ T, CICIONE C, RENDAL-VÁZQUEZ ME, FUENTES-BOQUETE I, *et al.* Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. **Differentiation.** 2011;81:162-71.
- FAUZA D. Amniotic fluid stem cells. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** 2004; 18:877-97.
- LOVATI AB, CORRADETTI B, CONSIGLIO AL, RECORDATI C, BONACINA E, BIZZARO D, *et al.* Comparison of equine bone marrow, umbilical Cord, and amniotic fluid – derived progenitor cells. **Vet. Res. Commun,** 2010;35:103-21.
- MIKI T, LEHMANN T, CAI H, STOLZ DB, STROM SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem cells.** 2005; 23:1549-59.
- PAROLINI O, CARUSO M. Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. **Placenta.** 2011; 32 (Suppl 2) : S186-95.
- TSAI MS, LEE JL, CHANG YJ, HWANG SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. **Hum. Reprod.** 2004; 19:1450-6.
- SHUANG-ZHI H, PING S, XI-NING P. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. **Chin Med Sci J.** 2010;25:211-4
- ZAGO MA, COVAS DT. **Celulas-tronco: a nova fronteira da medicina.** São Paulo: Atheneu; 2006.