

**UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DE LIGAMENTO LARGO DO  
ÚTERO DE CADELAS**

**VIVIANE RAPOSO FORTUNATO**

**VILA VELHA – ES**  
**MARÇO / 2016**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DE LIGAMENTO LARGO DO  
ÚTERO DE CADELAS**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**VIVIANE RAPOSO FORTUNATO**

**VILA VELHA**

**MARÇO / 2016**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F745c Fortunato, Viviane Raposo.  
Cultivo e caracterização in vitro de células tronco  
mesenquimais provenientes de ligamento largo do útero de  
cadela. / Viviane Raposo Fortunato – 2016.  
25 f.:

Orientadora: Betânia Souza Monteiro .  
Dissertação (mestrado em Ciência Animal)  
Universidade Vila Velha, 2016.  
Inclui bibliografias.

1. Genética veterinária. 2. Caes. 3. Celulas-Tronco. I.  
Monteiro, Betânia Souza. I. Universidade Vila Velha. III. Título  
CDD 636.0896042

**VIVIANE RAPOSO FORTUNATO**

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS PROVENIENTES DE LIGAMENTO LARGO DO ÚTERO DE  
CADELAS**

Dissertação apresentada a Universidade  
Vila Velha, como pré-requisito do Programa  
de Mestrado em Ciência Animal, para  
obtenção do grau de Mestre em Ciência  
Animal.

Aprovada em 30 de março de 2016,

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Carlos Eduardo Tadokoro (UVV)**

  
\_\_\_\_\_  
**Bianca Prandi Campagnaro (UVV)**

  
\_\_\_\_\_  
**Betânia Souza Monteiro (UVV - Orientadora)**

## DEDICATÓRIA:

*“Dedico este trabalho a Deus, base da minha vida. Aos meus pais, por todo apoio, vocês são os meus maiores exemplos. Ao meu marido, pelo fiel companheirismo. A minha filha, pelo seu sorriso sincero de todos os dias, me tornando a melhor pessoa do mundo. À minha orientadora, pelo ensino, paciência e amizade”.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar os meus caminhos e pelo dom da vida. Sempre me dando sabedoria para eu trilhar o melhor caminho.

À CAPES, pela bolsa de estudos que viabilizou os meus estudos.

À coordenação do Hospital Veterinário pela autorização para utilização das instalações.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciência animal que fizeram parte de toda a minha trajetória.

Aos funcionários do HV-UVV, Fábio, Terezinha, Lurdinha, tia Lúcia, Antônio, Adriano, Diego, Jukleber, Felipe, Irene o meu agradecimento por todo apoio.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Carlos Eduardo Tadokoro e Dra. Bianca Prandi Campagnaro pelas contribuições.

A minha família, em especial a minha mãe, Gilda e o meu pai, Izaias. Sou eternamente grata por tudo o que vocês fizeram por mim, obrigada pelos ensinamentos, sempre com muito amor. Tenho muito orgulho de vocês e espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim. Obrigada Vó, mulher guerreira que sempre me inspirou. Agradeço também a minha irmã Lidiane e o meu cunhado Luiz Paulo, obrigada pelos momentos de distração e apoio quando eu mais precisei.

Ao meu marido, companheiro, Marcus, uma das pessoas que mais acreditou na minha capacidade, seu incentivo e admiração me fizeram chegar até aqui. No decorrer desses dois anos você foi muito paciente e compreensivo, reconheço e agradeço de coração, o seu apoio foi fundamental. Obrigada por me tornar a cada dia uma pessoa melhor. Te amo.

À Liz, minha flor amada. Obrigada por me ensinar o que é verdade e me dar o sentimento mais puro. Você chegou para mostrar que sou capaz de amar alguém além de mim, e que sou mais forte do que eu penso. Obrigada filha, te amo muito.

À minha orientadora Dra. Betânia Souza Monteiro, que se tornou uma grande amiga.

Obrigada por me ensinar tantas coisas em que nunca pensei que fosse capaz de aprender, chegamos ao plano F e finalmente deu certo! E você sempre acreditando em mim e na minha capacidade, você me acolheu, independente do tema do projeto, das dificuldades, das minhas limitações, a sua certeza de que eu conseguiria me tornou a pessoa que sou hoje. Obrigada simplesmente por não desistir de mim.

Ao meu amigo CARLÃO. “Né Carlos?”. O melhor presente que o mestrado me deu foi a sua amizade. Tenho tantos motivos para te agradecer, mas vou começar agradecendo pela pessoa que você é, capaz de ajudar a todos, quem dera se no mundo tivesse mais “Carlos”! Com toda a sua simplicidade e honestidade, te admiro muito. PS: E agora??

A minha amiga/ irmã Laura, na graduação tive o prazer de conhecer uma das pessoas que mais admiro, não só como profissional, mas como pessoa. Te ter por perto acalma a alma, não tem outra explicação, obrigada!

A minha eterna professora Tatiana Champion, um agradecimento repleto de saudades, sou grata por ter tido a chance de ter aprendido com você. Uma das pessoas que mais me incentivou a entrar no mestrado, você faz parte da minha conquista.

As minhas queridas Júlias!! Duas mulheres maravilhosas! Vocês contribuíram muito para essa conquista. Picolli, obrigada por tantos “TÁ LOUCO”, o seu apoio com Mac donalds me ajudou muito. Cabi, você é muito capaz e dedicada, tem um lindo caminho a percorrer, obrigada por todo o apoio.

Aos meus amigos queridos, Alvaro, Gabriel, Juarez, Monique, Dariele, Amanda, Flávia Juliana, Thiago, Carlos, Laura e Júlias. Obrigada por todos os momentos em que passamos juntos, o dia a dia com vocês foi muito mais leve! Cada um de vocês tem a sua parte nessa conquista, muito OBRIGADA! “Alguém falou Outback?”.

Aos meus sogros, Ormenzinda e Derval, me acolheram e me apoiaram tanto. Como é bom ter uma segunda família. Obrigada Mel, pelo carinho com a minha filhota e por sempre estar a disposição para ajudar. Sou grata por ter vocês na minha vida.

Ao meu irmão e amigo Álvaro, obrigada por todo ensinamento e paciência, a sua ajuda e força foram fundamentais para a realização desse sonho. Me perdoe por todos os momentos de estresse. Me empresta?

Ao Fábio, Marlene e Caio, amigos queridos que sempre estiveram ao meu lado. Muito Obrigada.

Aos meus amigos, Lorena, Lara, Tati, Yasmin, Silmaira, Keila, Carol e Suélen, muitas vezes sem entender os motivos das minhas chateações, estiveram ao meu lado torcendo para que tudo desse certo.

A todos, muito obrigado!!!!!!



# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA E FIGURAS	VII
LISTA E GRÁFICOS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	01
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	05
PRIMEIRO RELATO DO USO DO LIGAMENTO LARGO DO ÚTERO COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS: ESTUDO <i>IN</i> <i>VITRO</i>	
Resumo	08
1. Introdução	09
2. Material e Métodos	10
2.1. Coleta de tecido	10
2.2. Extração e cultivo de Células tronco do ligamento largo do útero	11
2.3. Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán	12
2.4. Caracterização Celular	13
2.5. Diferenciação osteogênica	13
2.6. Coloração de Von Kossa	13
2.7. Diferenciação adipogênica	14
2.8. Coloração Oil red	14
3. Resultados	14
4. Discussão	18
5. Conclusão	21
6. Referências	22

## LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRO RELATO DO USO DO LIGAMENTO LARGO DO ÚTERO COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS: ESTUDO *IN VITRO*

- Figura 1** – Cultura celular após 24 horas e 72 horas de cultivo 16
- Figura 2** – Culturas em meio de diferenciação adipogênico e osteogênico 17

## LISTA DE GRÁFICOS

### **CAPÍTULO 2 - PRIMEIRO RELATO DO USO DO LIGAMENTO LARGO DO ÚTERO COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS: ESTUDO *IN VITRO***

**Gráfico 1** – Imunofenotipagem das células tronco mesenquimais 18

## RESUMO

FORTUNATO, Viviane Raposo, MSc., Universidade Vila Velha - ES, Março de 2016. **CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DE LIGAMENTO LARGO DO ÚTERO DE CADELAS.** Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas uma linhagem de células tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos. Diferentes protocolos de coleta e expansão desse tipo celular para modelos experimentais estão disponíveis na literatura científica. Contudo, protocolos bem fundamentados para realização de cultura dessas células indiferenciadas de cães e gatos são mais difíceis de serem encontrados e reproduzidos e, ainda, utilizam-se apenas a Medula óssea e o tecido adiposo como fontes doadoras de células. O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo viável para a cultura de células-tronco mesenquimais de cadelas a partir de ligamento largo do útero (LLU), realizando coleta, expansão, caracterização e diferenciação celular das culturas estabelecidas. Foram coletadas aproximadamente 1,0 cm<sup>3</sup> de LLU de 20 cadelas submetidas a ovariectomia (OH) eletivas, e as amostras foram processadas em laboratório de cultivo celular. No primeiro dia de cultura visualizou-se inúmeras células com formato arredondado, suspensas em meio de cultura, não permitindo identificar o tipo celular. Ademais, as culturas começaram a apresentar células aderentes, com morfologia fibroblastóides nas primeiras 24 horas após o plaqueamento no meio DMEM completo. A caracterização fenotípica obtida pela citometria de fluxo mostrou baixa expressão de marcadores de células hematopoiéticas CD45 (3,82 %) e CD11 (2,52%) e alta expressão de marcadores de células tronco CD90 (90,30 %) e CD73 (86,82 %). A cultura em diferenciação osteogênica apresentou nódulos de mineralização a partir de 7 dias em meio osteogênico e tornando mais evidente aos 21 dias de cultivo. A diferenciação adipogênica também exibiu a formação de vacúolos de gordura a partir do 15<sup>o</sup> dia em meio de diferenciação. A associação desses dados nos permitiu inferir que as células extraídas do LLU representam uma população de células tronco mesenquimais.

**Palavras chave:** fibroblastóides, citometria, diferenciação osteogênica, diferenciação adipogênica, aderência celular.

## ABSTRACT

FORTUNATO, Viviane Raposo, MSc., University Vila Velha- ES, March 2016. **IN VITRO CULTIVATION AND CHARACTERIZATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM THE BROAD LIGAMENT OF THE UTERUS OF FEMALE DOGS**. Supervisor: Betânia Souza Monteiro.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered a lineage of somatic stem cells and are present in perivascular regions of all adult tissues. Different collection and expansion protocols of this type of cell, for experimental models, are available in scientific literature. However, fundamental protocols for culture performance of these undifferentiated cells from cats and dogs are more difficult to be found and reproduced, and also, only bone marrow and adipose tissue are used as a source of donor cells. The present study aimed to establish a viable protocol for cultivation of mesenchymal stem cells from the broad ligament of the uterus (BLU) of female dogs, performing collection, expansion, characterization, and cell differentiation of the established cultures. Approximately 1.0 cm<sup>3</sup> of BLU from 20 female dogs submitted to elective ovariohysterectomy (OH) were collected, and the samples were processed in a cell culture laboratory. On the first day of cultivation innumerable round shaped cells, suspended in culture medium were visualized, disallowing identification of the cell type. Furthermore, the cultures began to present adherent cells, with fibroblast morphology within the first 12 hours after plating in the complete DMEM medium. Phenotypic characterization obtained by flow cytometry showed low expression of hematopoietic markers CD45 (3.82%) and CD11 (2.52%) and high expression of cell markers CD90 (90.30%) and CD73 (86.82%). Culture in osteogenic differentiation showed mineralized nodules starting from day 7 in osteogenic medium and becoming more evident after 21 days of cultivation. The adipogenic differentiation also exhibited formation of fat vacuoles starting from the 15th day in differentiation medium. Association of these data allowed us to infer that the cells extracted from the BLU represent a population of mesenchymal stem cells

**Keywords:** fibroblastoid, cytometry, osteogenic differentiation, adipogenic differentiation, cell adhesion.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As células tronco (CT) são células com capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversos tecidos, capazes de realizar a reparação e manutenção de órgãos (PITTENGER et al., 1999). Estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos, como o tecido adiposo, medula óssea, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos (PINTO FILHO et al., 2013).

Os primeiros estudos e conceitos de células tronco mesenquimais vem da década de 1960, com trabalhos de Alexander Friedenstein. Células da medula óssea submetidas a condições de cultivo *in vitro*, se aderiam ao plástico e se desenvolvia em unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (TILL et al., 1964).

As CT são classificadas quanto o seu potencial e a sua origem, sendo divididas em totipotentes, pluripotentes, unipotentes ou multipotentes. São células-tronco embrionárias (CTE) e não embrionárias ou somáticas (CTS), sendo também denominadas células tronco somáticas (ou adultas - CTS) (CLARKE et al., 2000; MORSCZECK et al., 2008; BJORNSON et al., 1999).

As CTE derivam dos blastômeros de embriões e são consideradas totipotentes por possuírem alta capacidade de se diferenciar em células da ectoderme, endoderme, mesoderme e ainda gametas masculinos e femininos (MANGANELLI et al., 2011). Podem também ser classificadas como pluripotentes quando são originadas da massa celular interna do blastocisto e também possuem capacidade de diferenciação nas camadas citadas acima, mas, não origina os anexos fetais (ROSLER et al., 2004).

As CTS são multipotentes, ou seja, já passaram por processo de diferenciação e seguem uma linhagem específica, mas ainda assim, podem formar vários tipos celulares. Possuem inúmeras fontes, como cordão umbilical, tecido adiposo, líquido amniótico, sistema nervoso central e medula óssea. As células unipotentes são capazes de gerar apenas um tipo específico celular (BAJADA et al., 2008; ABDALLAH E KASSEM, 2008). Já foram identificadas CTS em tecido cerebral (CICCOLINI, 2001), vasos sanguíneos (PELOSI et al., 2002), pele (TOMA et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001) e polpa dentária (MIURA et al., 2003).

Dentro do grupo das CTS existe uma variedade de tipos celulares como as células tronco hematopoiéticas (CTH) e células tronco mesenquimais (CTM). As CTH são formadoras comprometidas com todos os tipos de células sanguíneas enquanto as CTM, conhecidas por sua alta plasticidade, pode se diferenciar em vários tipos celulares como osteoblastos, condrócitos, adipócitos entre outros (NARDI, 2007). Acredita-se que essas células possuem uma importante função na regeneração após injúria tecidual (BYDLOWSKI et al., 2009).

As CTM estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos no organismo, desempenhando uma importante função imunomoduladora (WAN et al., 2008), entretanto, os mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados. Quando transplantadas, interagem com o tecido do receptor e desencadeiam a liberação de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, responsáveis pela modulação da resposta inflamatória e reparação tecidual (MONTEIRO et al., 2010). Na presença de um dano tecidual, há ativação e mobilização do sistema imune, recrutando os macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e ocorre a liberação dos mediadores inflamatórios, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), quimiocinas e outros (EMING et al., 2007, LUSTER et al., 2005).

A atividade imunomoduladora varia de acordo com a fonte de CTM, número de passagens, condições do paciente e quantidade transplantada (MA et al., 2014).

*In vitro*, as células tem capacidade de se expandir várias vezes, mantendo o seu potencial de crescimento. A densidade inicial de células, no início da cultura, é importante para assegurar uma boa taxa de expansão. Ao atingir a confluência, as células passam a diminuir a sua taxa de expansão, necessitando um número maior de passagens, podendo mais tarde prejudicar a sua qualidade (BYDLOWSKI et al., 2009). As fontes mais comuns de obtenção de CTM são medula óssea e tecido adiposo, contudo já foi cultivada a partir de polpa dentária e órgãos parenquimatosos (GRONTHOS et al., 2000).

Culturas de CTM derivadas da medula óssea geralmente são autólogas e para isso, é preciso submeter o paciente a procedimentos invasivos de coleta, sob anestesia local ou geral (PATERSON et al., 2014). Para evitar essa morbidade pós coleta, fontes alternativas estão sendo cada vez mais estudadas, com o objetivo de facilitar a coleta, o isolamento e a expansão celular, diminuindo as complicações em

doadores (EGGENHOFER et al., 2014). Como por exemplo, citam-se a extração celular de anexos fetais (GIOVANNI et al., 2008) e polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000) que demonstraram facilidade ao isolamento e cultivo celular.

Com o aumento do interesse em pesquisas sobre terapia celular, foi observada uma necessidade de definição dos critérios para células tronco. A *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) definiu três critérios que tem o objetivo de caracterização das mesmas. As células são plásticas-aderentes quando estão em cultura, que expressam os marcadores de superfície CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 e CD105 e não expressam CD14 ou CD11b, CD34, CD45 (endogлина), CD79 ou CD19 e MHC-II e possuem capacidade de se diferenciar em outras linhagens quando estimuladas *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Além dos marcadores citados acima, também foram relatadas outras proteínas de superfície que são expressas pelas CTM, como CD44, CD29, CD106 e CD166 (BARRY & MURPHY, 2004).

Um grande problema da caracterização destas células indiferenciadas é que não há marcadores antigênicos específicos e característicos apenas de CTM (BYDLOWSKI et al., 2009), e a caracterização é realizada por associação de informações. Células negativas para Stro-1 não são capazes de formar colônia, tornando este marcador um dos mais utilizados para identificação de CTM, contudo, cabe ressaltar que não é exclusivo de células tronco e sua expressão é perdida durante a expansão das culturas (MEIRELLES et al., 2006). A variação da origem de tecido, diferentes espécies e os variados métodos de isolamento celular podem contribuir para uma variação de marcadores de linhagens (BYDLOWSKI et al., 2009).

Em relação à terapia com CTM, estas podem ser realizadas por aplicação sistêmica ou aplicação no local lesionado e o sucesso da aplicação é dependente da mobilização de mecanismos de interação celular, sobrevivência no nicho receptor, ativação dos processos de recrutamento e diferenciação celular, e modulação dos sinais inflamatórios (LIU et al., 2009). Quando se optar por tratamentos por via intravenosa, é necessário um maior volume celular para a aplicação, já que as células se distribuem por diversos locais e não se restringem apenas a lesão (HORWITZ et al., 2002), contudo, esta é uma forma fácil de administra-las. Ainda, segundo DEL CARLO et al. (2008), as CTM podem ser transplantadas para o local



de lesão tecidual ainda indiferenciadas, para que sofram a diferenciação posterior por ação do nicho, ou podem ser transplantadas após sofrerem diferenciação in vitro.

Ainda há a opção da aplicação de células autógenas ou alógenas, e deve-se considerar as vantagens e desvantagens de cada uma. Por exemplo, utilizando a técnica do aspirado de medula, para células autógenas, ela se mostra pouco eficiente em pacientes idosos, visto que a quantidade de CTM na medula óssea diminui com a idade avançada. Outra forma de utilização de CTM autógenas é por isolamento, cultivo e expansão in vitro que se mostra a mais eficaz no processo de regeneração, porém requer um maior tempo para esse cultivo não permitindo uma utilização imediata (ALVES, 2013). O uso de CTM alógenas é uma alternativa que fornece uma grande quantidade de células em um período de tempo menor, já que elas são retiradas de banco de culturas celulares (ARINZEH et al., 2003).

Até o momento, não se demonstrou por meio dos vários estudos já realizados que o transplante de CTM acarretasse no desenvolvimento de neoplasias, contudo essa característica é observada nas CTE por apresentar maior indiferenciação, aumentando sua capacidade mitótica e podendo haver formação de teratomas ou outros tumores (ALVES, 2013).

A utilização das células-tronco para terapia vem sendo cada vez mais utilizada em pesquisas e em estudos clínicos e os resultados obtidos vão contribuindo para a formação de novos conceitos, expectativas e problemática dessa ciência que está em formação, renovando sempre a necessidade de novas respostas. Com esse intuito, o trabalho objetivou verificar se esse ligamento representa uma fonte de células tronco mesenquimais, com a pretensão de viabilizar um protocolo reprodutível de cultura de células-tronco mesenquimais de cadelas, pois se considera essa fonte de fácil aquisição nas rotinas cirúrgicas veterinárias.

## 2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALVES, E.G.L. Células tronco mesenquimais de cães associadas ou não à vidro bioativo, diferenciação osteogênica in vitro e tratamento de defeito ósseo crítico. p. 26-32, 2013. Tese de Doutorado em Ciência Animal – Curso de pós graduação em ciência animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- ARINZEH, T.L. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-size canine segmental defect. *J. bone join surg. Am.* V.85, p.1927-1935, 2003.
- BAJADA, S.; MAZACOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine*, v. 2, p.169–183, 2008.
- BARRY, F.P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 568–584, 2004.
- BJORNSON, C. R.; RIETZE, R. L.; REYNOLDS, B. A.; MAGLI, M. C.; VESCOVI, A. L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, v. 283, p. 534-537, Jan.1999.
- BYDLOWSKI, S.P, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(1):25-35.
- CASTRO-SILVA, I. I., COUTINHO, L. A. C. R., GRANJEIRO, J. M. Revisão sistemática sobre o uso de células-tronco mesenquimais em terapias de perdas ósseas. *Innov Implant J, Biomater Esthet*, São Paulo, v.5, n. 3, p. 29-34, 2010.
- CICCOLINI, F. (2001).“Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development”. *Mol Cell Neurosci* 17(5): 895-907.
- CLARKE, D. L.; JOHANSSON, C. B.; WILBERTZ, J.; VERESS, B.; NILSSON, E.; KARLSTROM, H.; LENDAHL, U.; FRISÉN, J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, v. 288, p.1660-1663, Junho. 2000.
- DEL CARLO, R. J. et al. Células tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. *Ciência veterinária nos tópicos.* V.11, n.1, p. 167-169, 2008.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*, v. 127, n. 3, p. 514–25, 2007.

FIGUEROA, F. E., CARRION, F., VILLANUEVA, S., KHOURY, M. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol. Res.* 45:269-277, 2012.

GIOVANNINI, S.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET P, NESIC, D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 2008;76:118–29. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00207.x.

HORWITZ, E.M. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implication for cell therapy of bone. *The Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA.* v.99, n.13, p. 8932-8937, 2002.

LEAL, A. M. O., VOLTARELLI, J. C. Perspectivas da terapia com células-tronco para diabetes mellitus tipo 2. *Vet. Bras. Hemoter.* 2010; 32(4):329-334

LUSTER, A. D.; ALON, R.; ANDRIAN, U. H. VON. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology*, v. 6, n. 12, p. 1182–90, 2005.

MANGANELLI, G. et al. Embryonic Stem Cells: from Blastocyst to in vitro Differentiation. Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications, Prof. Craig Atwood (Ed.), ISBN: 978-953-307-197-8, 2011.

MIURA, M., S. GRONTHOS, et al. (2003). "(SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5807-12.

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

MORSCZECK, C. et al., Somatic Stem Cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest*, v12, p 113-118, 2008.

NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genética na Escola*, p. 25-29, 2007.

PATERSON, Y.Z; RASH, N.; GARVICAN, E.R; PAILLOT, R; GUEST, D.J. Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:90. doi:10.1186/scrt479.

PELOSI, E., M. VALTIERI, et al. (2002). "Identification of the hemangioblast in postnatal life". *Blood* 100(9): 3203-8.

PINTO FILHO, S.T.L., et al. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. *Vet. e Zootec.* 2013; 20 (Edição Comemorativa): 49-59.

ROSLER, E. S.; FISK, G. J.; ARES X.; ARES, X.; IRVING, J.; MIURA, T.; RAO, M. S.; CARPENTE, M. K. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Developmental Dynamics*, v. 229, p. 259–274, 2004.

ZUK, P. A., M. ZHU, et al. (2001). “Global and societal implications of the diabetes epidemic”. *Nature* 414(6865): 782-7.

WAN, C. D.; CHENG, R.; WANG, H. B.; LIU, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international*, v. 7, n. 1, p. 29–33, 2008.

1           **3. PRIMEIRO RELATO DO USO DO LIGAMENTO LARGO DO ÚTERO**  
2                           **COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS: ESTUDO**

3   ***IN VITRO***

4  
5           VIVIANE RAPOSO FORTUNATO<sup>a\*</sup>, CARLOS HENRIQUE TAVARES MATHIAS<sup>b</sup>, LAURA  
6           MONTEIRO DE CASTRO CONTI<sup>b</sup>, ALVARO DE PAULA LAGE OLIVEIRA<sup>c</sup>; JULLIA FERREIRA  
7           CABIDELLI<sup>d</sup>, JULIANA STELZER ZARDO<sup>a</sup>, RAYSSA MACIEL ATHAYDE<sup>e</sup>; BETÂNIA SOUZA  
8   MONTEIRO<sup>f</sup>  
9

10           <sup>a\*</sup> Mestranda em Ciência Animal pela Universidade Vila Velha - raposovivi@gmail.com, juliana\_dx@hotmail.com

11           <sup>b</sup> Msc. Médico Veterinário da Universidade Vila Velha, carloshenriquetm@gmail.com   lauramcconti@gmail.com

12           <sup>c</sup> Doutorando da Universidade Federal de Minas Gerais, olveira.medvet@hotmail.com

13           <sup>d</sup> Estudante de graduação de Medicina Veterinária e Iniciação Científica do Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular da  
14           Universidade de Vila Velha, julia.cabidelli@hotmail.com

15           <sup>e</sup> Mestranda da Universidade Federal de Minas Gerais, athayde\_rm@hotmail.com

16           <sup>f</sup> Professora do Programa de Pós Graduação Ciência Animal e Coordenadora do grupo de pesquisa do Laboratório de Células  
17           Tronco e Terapia Celular da Universidade Vila Velha, betania.monteiro@uvv.br  
18

19  
20           **RESUMO**

21           O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo viável para a cultura de células-  
22           tronco mesenquimais de cadelas a partir de ligamento largo do útero (LLU), realizando  
23           coleta, expansão, caracterização e diferenciação celular das culturas estabelecidas.  
24           Foram coletadas aproximadamente 1,0 cm<sup>3</sup> de LLU de 20 cadelas submetidas a  
25           ovariohisterectomia (OH) eletivas, e as amostras foram processadas em laboratório de  
26           cultivo celular. No primeiro dia de cultura visualizou-se inúmeras células com formato  
27           arredondado, suspensas em meio de cultura, não permitindo identificar o tipo celular.  
28           Ademais, as culturas começaram a apresentar células aderentes, com morfologia  
29           fibroblastóides nas primeiras 24 horas após o plaqueamento no meio DMEM completo.  
30           A caracterização fenotípica obtida pela citometria de fluxo mostrou baixa expressão de  
31           marcadores de células hematopoiéticas CD45 (3,42 %) e CD11 (2,52 %) e alta  
32           expressão de marcadores de células tronco CD90 (90,3 %) e CD73 (86,82 %). A cultura  
33           em diferenciação osteogênica apresentou nódulos de mineralização a partir de 7 dias em  
34           meio osteogênico e tornando mais evidente aos 21 dias de cultivo. A diferenciação  
35           adipogênica também exibiu a formação de vacúolos de gordura a partir do décimo  
36           quinto dia em meio de diferenciação. A associação desses dados nos permitiu inferir que  
37           as células extraídas do LLU representa uma população de células tronco mesenquimais.

38           **Palavras chaves:** fibroblastóides, citometria, diferenciação osteogênica, diferenciação  
39           adipogênica, aderência celular.

## 40 INTRODUÇÃO

41

42 O interesse pelas células tronco vem aumentando consideravelmente nas últimas  
43 décadas, tanto na Medicina Humana quanto na Medicina Veterinária, pois são células  
44 com grande capacidade de proliferação e autorrenovação, capazes de responder a  
45 estímulos do organismo e originar diferentes tipos celulares mais especializados  
46 (PEREIRA, 2008). Estudos com esse grupo celular vêm sendo realizados com o intuito  
47 de obter novas descobertas e desenvolver novas aplicabilidades para terapia celular,  
48 principalmente as células tronco mesenquimais (CTM) (RIBITSCH et al., 2010).

49 As CTM estão presentes em todos tecidos adultos, em região perivascular,  
50 porém, em pequena quantidade. São células multipotentes do tipo fibroblástico capazes  
51 de se aderir em substrato plástico, regenerar e diferenciar em diferentes tipos celulares  
52 (MANIERI & STAPPENBECK, 2011; MONTEIRO et al., 2009; PITTENGER et al.,  
53 1999) e tem como principais fontes de coletas a medula óssea (MO) e o tecido adiposo  
54 (MEIRELLES et al., 2008).

55 Devido à característica multipotente, estas células são capazes de se diferenciar  
56 tanto *in vitro* ou *in vivo*, originando osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios,  
57 células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras células e podem ser responsáveis por  
58 reparação em todos os tecidos do organismo (GIORDANO et al., 2007).

59 Para serem consideradas CTM, a sociedade internacional de terapia celular  
60 (*International Society of Cellular Therapy* – ISCT) estabeleceu três critérios que são  
61 necessários cumprir: a capacidade de adesão em substrato plástico; expressão positiva  
62 para marcadores de superfície (CD73, CD90 e CD105) e negativa (CD14 ou CD11b,  
63 CD34, CD45, CD79 ou CD19 e MHC-II) e capacidade de se diferenciar em  
64 osteoblastos, condroblastos e adipócitos, em condições *in vitro* (DOMINICI et al.,  
65 2006).

66 Ainda que existam disponíveis na literatura científica diferentes protocolos de  
67 coleta e expansão desse tipo celular para modelos experimentais oriundos de amostras  
68 de medula óssea e tecido adiposo provenientes de camundongos, ratos, coelhos,  
69 macacos e humanos, para cães e gatos não se encontra com facilidade protocolos bem

70 fundamentados para realização de cultura dessas células indiferenciadas e nem relatos  
71 de fontes alternativas destas células (URANIO et al. 2011). Na carência destas fontes  
72 alternativas, o LLU, proveniente de cadelas submetidas à ovariectomia (OH),  
73 surge como uma esperança doadora de células, pois se sabe que o tecido é uma lâmina  
74 peritoneal bilateral que se origina de um prolongamento do teto do abdômen e pelve  
75 (SLATTER, 2007).

76 Esta pesquisa objetivou propor e avaliar se o ligamento largo do útero (LLU) de  
77 cadelas representa uma fonte de CTM, com a pretensão de viabilizar um protocolo  
78 reprodutível de cultura de células-tronco mesenquimais de cadelas, pois se considera  
79 essa fonte de fácil aquisição nas rotinas cirúrgicas veterinárias.

80

## 81 **MATERIAL E MÉTODOS**

82

83 O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de  
84 Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética, Bioética e  
85 Bem Estar Animal (CEUA) da Universidade Vila Velha (UVV), processo n<sup>o</sup> 295/2013.

86 A coleta do LLU foi realizada no centro cirúrgico de pequenos animais do  
87 Hospital Veterinário “Professor Ricardo Alexandre Hippler” e a cultura de células foi  
88 realizada no Laboratório de Célula Tronco e Terapia Celular – LCET, localizado no  
89 prédio de Biopráticas, ambos pertencentes a Universidade Vila Velha (UVV/ES). A  
90 etapa de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e  
91 Biomolecular, localizado no Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade  
92 Federal de Minas Gerais.

93

### 94 **Coleta de Tecido**

95 O tecido foi coletado de 20 cadelas adulto-jovens, hípidos, com a idade entre 1 a  
96 5 anos, pesando entre 3 a 15 Kg, todas em diestro, que seriam submetidas ao  
97 procedimento de ovariectomia (OH) eletiva, no Hospital Veterinário “Professor

98 Ricardo Alexandre Hippler” da Universidade Vila Velha (HV-UVV). Os fragmentos de  
99 ligamento largo do útero (LLU) foram coletados imediatamente após a secção do  
100 aparelho reprodutor, retirando 1,0 cm<sup>3</sup> (aproximadamente 1,0 grama). Para a coleta  
101 padronizou-se evitar locais que continham vasos sanguíneos.

102 As amostras foram acondicionadas em tubos falcon n<sup>o</sup> 15 contendo 10,0 mL de  
103 meio de cultura Dulbecco’s *Modiffed Eagle Medium* baixa glicose (DMEM, Sigma-  
104 Aldrich, USA) completo [enriquecido com 60 µg/L de gentamicina, 100 U/mL de  
105 penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 25µg/mL de anfotericina e 10% de soro fetal  
106 bovino] (Soro Fetal Bovino, SFB, Gibco<sup>®</sup>, ThermoFisher Scientific, USA), à  
107 temperatura ambiente e encaminhada para o Laboratório de Células Tronco e Terapia  
108 Celular (LCET) da Universidade Vila Velha, para o processamento.

109

#### 110 **Extração e cultivo de células tronco do ligamento largo do útero**

111 No LCET, as amostras de LLU foram lavadas duas vezes com tampão fosfato  
112 salino (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS, BioWhittaker<sup>®</sup>,USA) objetivando remoção de  
113 sangue e debris celulares.

114 As amostras foram fragmentadas em partículas menores com tesoura cirúrgica  
115 estéril e, posteriormente, foram colocadas em outro tubo falcon n<sup>o</sup> 50 contendo 20,0 mL  
116 de uma solução estéril de 1,5% de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, USA), para  
117 digestão do LLU e liberação das células.

118 Em seguida, a amostra foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 45  
119 minutos, sendo que a cada 10 minutos a amostra foi vigorosamente agitada para facilitar  
120 o processo de digestão. Transcorrido o tempo de digestão, a amostra foi centrifugada  
121 por 10 minutos a 694G à 22°C, o sobrenadante contendo a fração de ligamento foi  
122 descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 10,0 mL PBS para lavagem e retirada dos  
123 resíduos de colagenase.

124 A amostra foi colocada em outro tubo falcon de 15,0 mL e novamente  
125 centrifugada por 10 minutos a 694G à 22°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi  
126 novamente descartado e o *pellet*, fração estromal, foi ressuspensão em 10,0 mL de meio  
127 de cultura para células tronco, DMEM completo com baixa glicose.



128 Uma alíquota de 2,0 mL do meio com as células ressuspensas foi transferida  
129 para cada garrafa de cultivo celular T75 e 8,0 mL de meio DMEM foram adicionados  
130 em cada garrafa, sendo preparadas 5 garrafas para cada tecido cultivado. Realizou-se  
131 homogeneização e as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48  
132 horas, o meio de cultura foi removido, as garrafas foram lavadas duas vezes com PBS e,  
133 novamente, acrescentado 10,0 mL de meio de crescimento DMEM. O meio de cultivo  
134 foi trocado a cada dois a três dias, segundo o metabolismo celular.

135 Assim que era atingido 80 a 90% de confluência, as células eram submetidas ao  
136 processo de tripsinização, para desprendimento das células da garrafa. O meio de  
137 cultura de cada garrafa era desprezado, a garrafa lavada com 10,0 mL de PBS e  
138 adicionados 4,0 mL de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) . As garrafas foram  
139 incubada por 4 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e transcorrido o tempo de ação  
140 da tripsina-EDTA, era acrescentado nas garrafas 4,0 mL de DMEM completo. O  
141 conteúdo da garrafa foi transferido para tubos falcon de 15 mL e centrifugados por 10  
142 minutos a 694G. Após isso o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em  
143 DMEM enriquecido com 10% de SFB.

144 Após a quarta passagem, as culturas foram caracterizadas fenotipicamente  
145 quanto à expressão de CD11, CD45, CD73, CD90, MHC-I e MHC-II e submetidas à  
146 diferenciação osteogênica e adipogênica por sete, 14 e 21 dias.

147

#### 148 **Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán**

149 Após cada etapa de tripsinização culturas foram avaliadas quanto à viabilidade  
150 celular pelo azul de Tripán. Após a etapa de centrifugação, uma alíquota de 50,0 µL de  
151 células era colocada sobre um poço de uma placa e acrescentado 50,0 µL azul de  
152 Tripán. As células viáveis (transparentes) e inviáveis (em azul) de cada grupo foram  
153 quantificadas em câmara de Neubauer.

## 154 **Caracterização Celular**

155 As células de quarta passagem foram submetidas separadamente à ação da  
156 tripsina e ressuspendidas em 2,0 mL de solução de PBS em eppendorfs, na concentração  
157 de  $1 \times 10^6$  células/eppendorf, foram centrifugados para formação de um pellet. As  
158 amostras foram caracterizadas por citometria de fluxo por meio da análise da expressão  
159 de moléculas da superfície celular para MHC-I, MHC-II, CD11 (anti-CD11b; abCAm),  
160 CD90 (anti-CD90 done Ox-7 mouse; AbCam), CD45 (anti-CD45 clone 69 mouse; BD  
161 Bioscience, San Jose, California, USA) e CD73 (anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse;  
162 AbCam Cambridge, Massachusetts, USA).

163 Após adicionar os anticorpos nas amostras a serem analisadas, elas foram  
164 incubadas por 30 minutos à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e  
165 centrifugadas a 694G por 7 minutos, foi descartado o sobrenadante e as células  
166 ressuspendidas em 200,0 µL de PBS. Células sem qualquer tipo de marcação foram  
167 utilizadas para estabelecer um gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer  
168 a população analisada. Foi realizada a leitura no aparelho citômetro de fluxo BD Accuri  
169 C6. Foram adquiridos 30.000 eventos. Os resultados foram avaliados e apresentados na  
170 forma de histograma no programa FlowJo (FlowJo 7.6.3<sup>®</sup>).

171

## 172 **Diferenciação osteogênica**

173 Após o quarto repique, as culturas foram submetidas separadamente à ação da  
174 tripsina e plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, em quatro repetições, em  
175 garrafas T25. Após a obtenção de 60 a 70% de confluência celular o meio basal foi  
176 substituído por 5,0 mL de meio osteogênico (StemPro<sup>®</sup> Osteogenesis Differentiation,  
177 ThermoFisher Scientific, USA) conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida  
178 as culturas foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sup>2</sup> e avaliadas por sete, 14 e 21 dias.  
179 Transcorridos esses períodos foram avaliados por meio da coloração Von Kossa.

### 180 **- coloração de Von Kossa:**

181 Após 21 dias foi realizado a coloração de Von Kossa. O meio de diferenciação foi  
182 desprezado e a placa lavada duas vezes com PBS. Foi adicionado 4,0 mL de  
183 paraformaldeído 4%, após uma hora, foi desprezado o conteúdo e a placa lavada com

184 água destilada. Foi adicionado 4,0 mL de nitrato de prata e incubado sob luz ultravioleta.  
185 Após 1 hora de incubação, foi lavado com água destilada, mergulhado em tiosulfato de  
186 sódio e novamente lavado com água destilada e para finalizar, corado com eosina durante  
187 5 minutos.

188

### 189 **Diferenciação adipogênica**

190 Após a quarta passagem as células de cada grupo foram submetidas  
191 separadamente à ação da tripsina e plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, em  
192 seis garrafas T25. Após a obtenção de 60 a 70% de confluência celular o meio basal foi  
193 substituído por 5,0 mL meio adipogênico (StemPro<sup>®</sup> Adipogenesis Differentiation Kit,  
194 ThermoFisher Scientific, USA). Em seguida as células foram cultivadas a 37°C e 5% de  
195 CO<sup>2</sup> por 21 dias e o meio de cultura trocado a cada três dias. Transcorrido esse período as  
196 células foram fixadas em formalina 10% por 60 minutos, coradas pela técnica de *Oil Red*  
197 e avaliados por microscopia óptica, para confirmação da diferenciação adipogênica.

#### 198 **- coloração *Oil Red***

199 As células foram fixadas com formalina 10%, deixando agir por 30 minutos. A  
200 solução foi removida e as garrafas lavadas com PBS três vezes. Foi adicionado  
201 isopropanol 60% por 5 minutos, retirado e adicionado à solução *Oil Red* deixando-a agir  
202 por 10 minutos. A solução foi retirada e as placas lavadas com isopropanol uma vez e  
203 depois lavado com PBS três vezes novamente.

204

205 Todas as etapas de cultura celular descritas tiveram as garrafas diariamente  
206 avaliadas e fotografadas utilizando microscopia óptica eletrônica.

207

## 208 **RESULTADOS**

209 A cultura inicial foi estabelecida obedecendo ao mínimo de  $1 \times 10^6$  células por  
210 garrafa e para cada 1,0 grama do tecido coletado foram cultivadas 2 garrafas. A taxa de  
211 viabilidade celular observada foi sempre superior a  $2,8 \times 10^6$ .

212 Inicialmente, as células apresentavam-se com formato arredondado (Figura 1A)  
213 e mononucleares e após 24 horas de cultivo celular, foi possível observar inúmeras  
214 células arredondadas e debris celulares, suspensas no meio de cultura e presença de  
215 pouca células com formato fibroblastóide aderidas ao plástico, aproximadamente 4  
216 células por campo (Figura 1B).

217 No segundo dia de cultivo foi possível fazer a troca do meio de cultura,  
218 eliminando as células não aderentes e observando uma quantidade maior de células  
219 aderidas, ocupando aproximadamente 15% da superfície da garrafa.

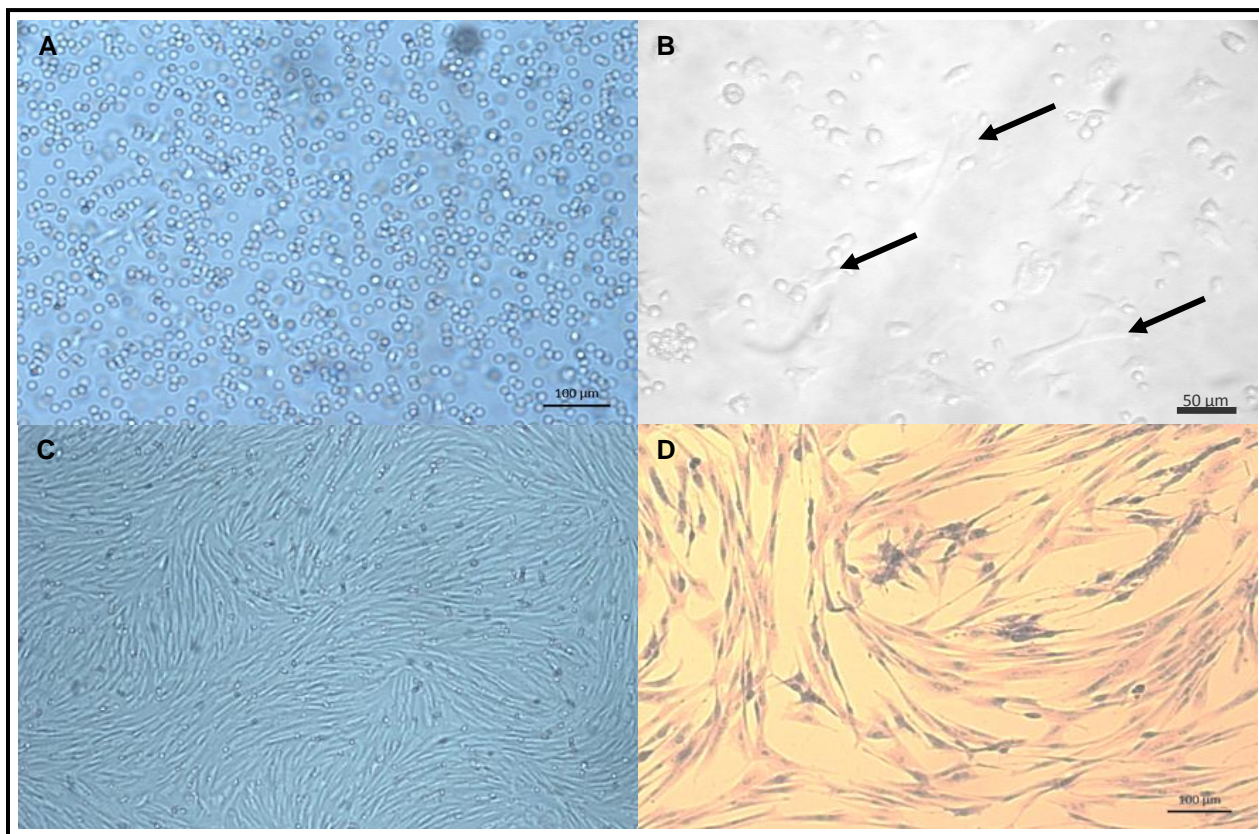
220 Com quatro dias de cultura celular, as garrafas apresentaram confluência de 80%  
221 (Figura 1C), permitindo a realização da primeira etapa de tripsinização (primeira  
222 passagem). Após cada passagem, as células apresentavam formato mononuclear  
223 suspensas no meio de cultura e novamente tornavam-se a aderir ao substrato plástico em  
224 totalidade dentro de 24 horas, alcançando nova confluência de 80% de células com  
225 aproximadamente 3 dias. Uma das garrafas apresentando confluência de 80% foi  
226 processada para coloração giemsa e registro fotográfico (Figura 1D).

227 Em geral, as culturas realizadas demoraram cerca de 12 a 15 dias até alcançar a  
228 quarta passagem.

229 As CTM derivadas de LLU apresentaram resposta positiva para a diferenciação  
230 tanto para osteogênico quanto adipogênico. Na diferenciação osteogênica, com sete dias  
231 já era possível uma discreta deposição de matriz extracelular rica em cálcio, com 14 e  
232 21 dias, observou-se a formação de nódulos de mineralização (Figura 2A), confirmados  
233 com a coloração de Von Kossa.

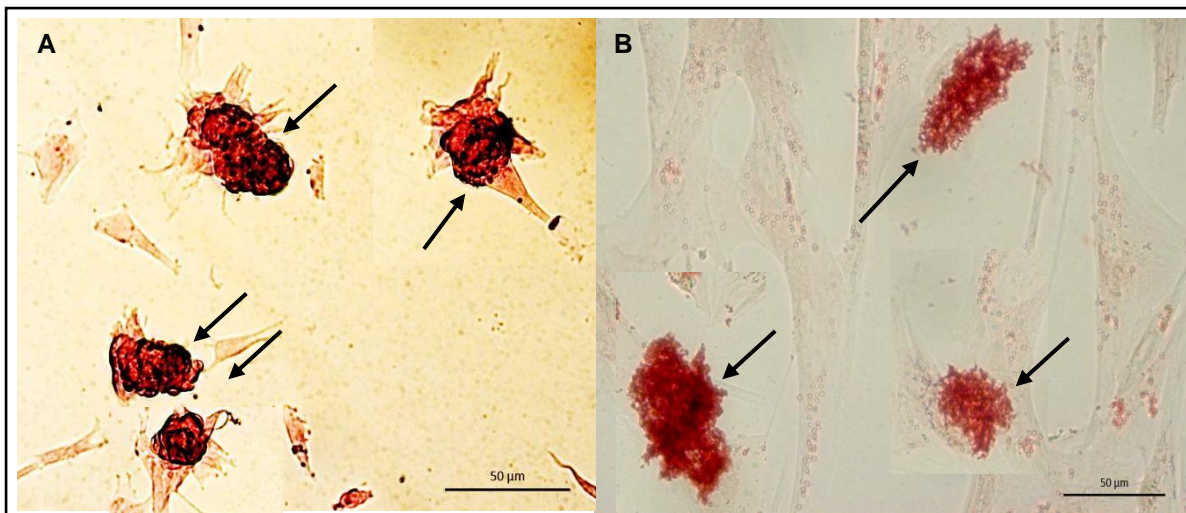
234 As CTM também foram submetidas em meio de diferenciação e aos sete dias as  
235 células não apresentaram diferenciação adipogênica. Aos 14 dias, verificou-se a  
236 presença de gotículas de gordura (Figura 2B), que foram evidenciadas pela coloração  
237 Oil red e visibilizados em microscopia. Comportamento similar foi verificada na cultura  
238 de 21 dias.

239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249



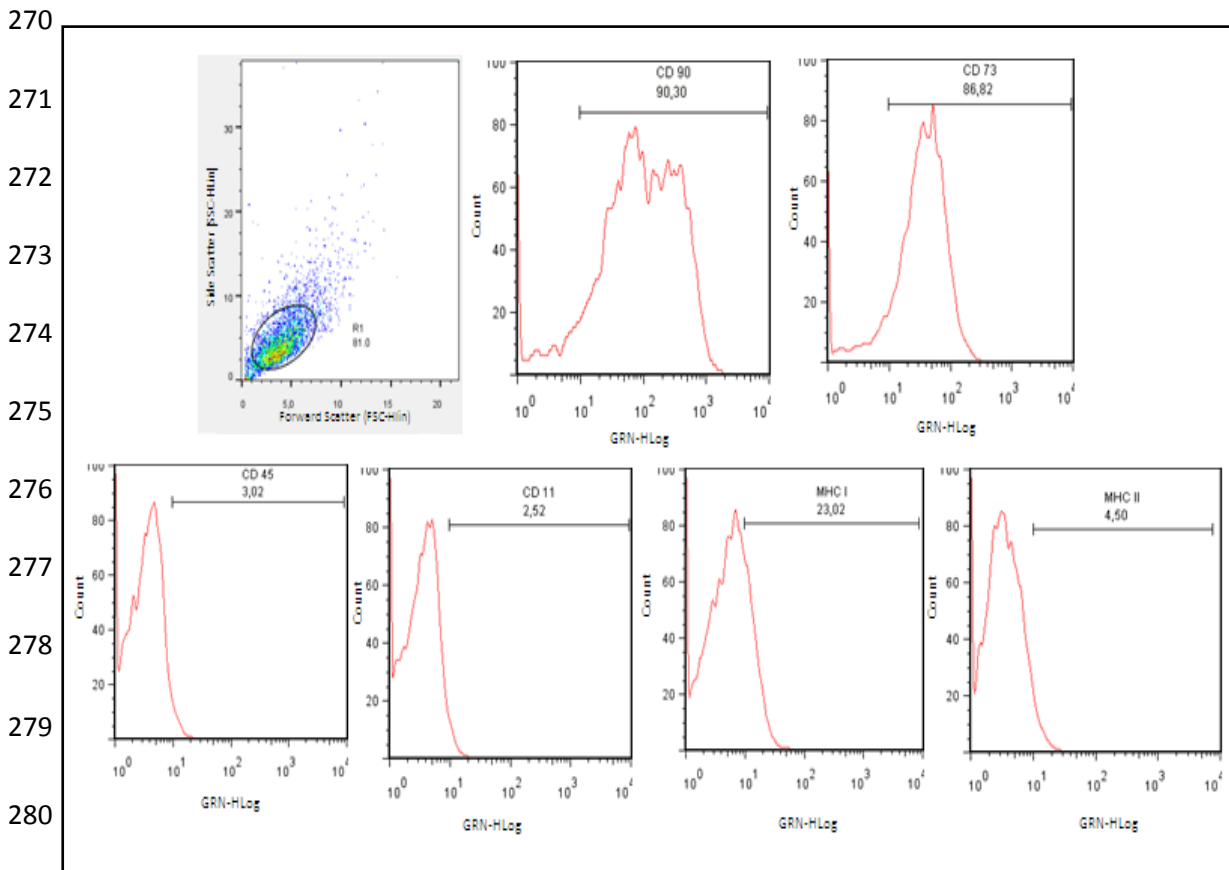
250 **Figura 1** - **A)** Células observadas após o processamento inicial do LLU apresentando morfologia  
251 arredondada. **B)** Células com formato fibroblastóides (seta) aderidas à superfície plástica da garrafa, após  
252 24 horas do estabelecimento da cultura celular. **C)** Cultura apresentando confluência celular superior a 80  
253 % e células com morfologia fibroblastóide e aderidas ao substrato da garrafa de cultura **D)** Morfologia  
254 fibroblastóide com coloração Giemsa.

255  
256  
257  
258  
259  
260  
261



262 **Figura 2** – Fotografia obtida por meio de microscopia óptico invertido. **A)** Formação de nódulos  
263 calcificados (seta) permeando células em diferenciação, evidenciados pela coloração Von Kossa,  
264 observados aos 14 dias no meio de diferenciação. **B)** Presença de vacúolos de gordura (seta) identificados  
265 por meio da coloração de Oil red, em cultura de 14 dias no meio de diferenciação.

266 Foi realizada a imunofenotipagem das CTM de quarta passagem e as análises  
267 revelaram expressão negativa de CD11 em 97,48%, de CD45 em 96,18%, de MHC-I,  
268 95,5% e de MHC-II, 86,82%, enquanto a expressão positiva foi de 77,18% para CD73  
269 e 90,3% para CD90.



281

282 **Figura 3-** Avaliação fenotípica das células tronco mesenquimais derivadas do ligamento largo do útero  
283 de cadelas. A) Gráfico de granulocidade (SSC) versus tamanho (FSC) demonstrando a população celular  
284 selecionada para estudo (R1). B a G) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro  
285 da população selecionada (R1), com os anticorpos anti-CD90, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD11, anti-  
286 MHC I e anti-MHC-II, respectivamente. As amostras revelaram expressão positiva de 90,30% para CD90  
287 (B) de 86,82% para CD73 (C) e expressão negativa de 96,18% para CD45 (D) de 97,48% para CD11 (E),  
288 de 77,18% para MHC I (F) e de 95,50% para MHC II (G).

289

## 290 DISCUSSÃO

291 Conforme indicações da ISCT, no presente estudo, estabeleceu-se um protocolo  
292 de isolamento e cultivo de CTM provenientes do LLU em cadelas. Em outros trabalhos,  
293 os autores relataram sucessos com cultivo celular provenientes de medula óssea e  
294 órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2006), epitélio amniótico (MIKI et al.,

295 2005), polpa dentária (GRONTHOS et al., 2002) e tecido adiposo (ZUK et al., 2001),  
296 entretanto, esse é o primeiro relato utilizando o ligamento largo uterino como fonte  
297 viável de células.

298 Destaca-se ainda que o processo de coleta LLU, um tecido advindo de castração  
299 de cadelas, reforça a vantagem de utilizar essa fonte de CTM em relação à outras fontes,  
300 como por exemplo, a utilização da medula óssea. A OH é uma das cirurgias eletivas  
301 mais realizadas na rotina cirúrgica veterinária e todo o aparelho reprodutor que é  
302 seccionado da cadela geralmente é descartado. O tecido a ser coletado, que outrora era  
303 considerado lixo, agora poderá ser utilizado para a manutenção de banco de células,  
304 pois, HARE et al. (2012) já demonstraram que a aplicação alogênica deste grupo celular  
305 em terapias é tão eficaz quanto aplicações autôgenas. Entretanto, quando se optar pela  
306 utilização de medula óssea como fonte de células, será necessário anestésiar o animal  
307 apenas para coletar amostras (CASTANIA, 2007).

308 Para conhecer as particularidade e capacidade das possíveis fontes, é necessária  
309 uma avaliação da eficiência de isolamento e cultivo. Ficou comprovado o tecido  
310 coletado forneceu grande quantidade de células mononucleadas e arredondadas e, que a  
311 partir de 24 horas de cultura, estas células passaram a apresentar formato fibroblastóide.  
312 Comportamento celular semelhante ao descrito anteriormente, foi observado por  
313 STREM et al (2005) ao cultivarem células derivadas de tecido adiposo, que é umas das  
314 fontes mais utilizadas em pesquisas e terapias na medicina humana e veterinária. Em  
315 contra partida, BITTENCOURT et al. (2006) utilizando CTM da MO de camundongos,  
316 relataram que as células coletadas só exibiram a alteração da morfologia celular com 72  
317 horas de cultura.

318 Em relação ao formato fibroblastóide apresentado pelas células aderidas, sabe-se  
319 que essa característica é um dos critérios das necessárias para a classificação das CTM  
320 de acordo com a ISCT. Todavia, mesmo alterando o seu formato, ainda não é possível  
321 afirmar que trata-se de uma células tronco pois existem outras células, como os próprios  
322 fibroblastos, que podem estar presentes nas fases iniciais da cultura e que também  
323 podem se aderirem ao plástico. A medida que a cultura é submetida a troca de meios e  
324 etapas de tripsinização, essa heterogeneidade da cultura vai diminuindo, e outros tipos  
325 celulares contaminantes, também serão eliminados (JAVAZON et al., 2004) e a cultura  
326 tornando-se homogênea.



327 O segundo critério necessário para a qualificação de uma célula como tronco é  
328 expressões positivas de CD13, CD29, CD54, CD73, CD90, CD106 e expressões  
329 negativas de CD34, CD45, CD14, CD11B, CD79, OU CD19 e HLA-DR, pelo menos  
330 em 95% das células em cultura (DOMINICI et al., 2006). As células provenientes de  
331 LLU apresentaram expressão positiva para marcadores celulares de superfície CD11,  
332 CD90 e expressão negativa dos marcadores CD45, CD73 e por meio destas  
333 características imunofenotípicas, é possível indicar que uma boa parcela da população  
334 de células no cultivo são CTM.

335 Lima et al. (2012) avaliando a imunofenotipagem de CTM oriundas da MO de  
336 cães, obtiveram expressão positiva para CD44 (97,1%) e negativa para CD34 (68,5%).  
337 De maneira análoga, ao avaliar uma cultura de CTM de tecido adiposo, Alves (2013)  
338 utilizou marcadores de células hematopoiéticas CD45 e CD34, onde teve expressão  
339 negativa para células analisadas e expressão positiva para marcadores de células tronco  
340 CD90 e CD29. A baixa expressão de CD45 e CD34 demonstra que não há isolamento  
341 de células tronco hematopoiéticas na cultura (TAKEMITSU et al., 2012).

342 Outros marcadores podem ser utilizados em cães, como o CD140a, CD117  
343 (MARTINELLO et al., 2011), entretanto os autores salientam que para comprovação  
344 metodológica, é suficiente utilizar pelo menos dois marcadores de expressão negativa e  
345 dois com expressão positiva.

346 O terceiro critério estabelecido é a capacidade de diferenciação das células  
347 indiferenciadas, *in vitro*, em células da linhagem mesodermal como osteoblastos,  
348 condrócitos e adipócitos (MEIRELLES & NARDI, 2006). Este processo de  
349 diferenciação ocorre quando uma célula adquire uma nova morfologia e característica  
350 funcional (THEISE & KRAUSE, 2002), como pode-se observar a partir do sétimo dias  
351 em que as células de quarta passagem foram colocadas em meio osteogênico e a partir  
352 do décimo quarto dia que as culturas foram colocadas em meio de diferenciação  
353 adipogênico.

354 Em relação à presença dos vacúolos de gordura, no presente trabalho foram  
355 observados a partir dos 14 dias, enquanto Nogueira (2009) diferenciando CTM  
356 extraídas de polpa dentária evidenciou a modificação das células em diferenciação e a  
357 produção dos vacúolos aos 10 dias. Provavelmente, essa diferença no tempo de

358 observação deve-se à maior quantidade de células que o autor plaqueou no seu  
359 experimento. No momento que uma célula inicia seu processo de diferenciação, há um  
360 incremento de fatores de crescimento no meio, que reforçam a sinalização para a  
361 diferenciação, gerando maior estímulo para as demais células.

362 Em diferenciação osteogênica, os nódulos de coloração amarronzados ocorrem  
363 devido a transformação de uma células fibroblástica alongada para uma forma poligonal  
364 osteoblastica que se agrupam e passam a produzir matriz óssea (PAYUSHINA et al.,  
365 2006). A diferenciação osteogênica é identificada pelo colágeno tipo I, que é o principal  
366 constituinte da matriz óssea, sendo expresso também por osteoblastos (NAKASHIMA  
367 et al., 2002).

368 A formação de nódulos de calcificação ocorre, pois, segundo OTSUKA et al.  
369 (2000), as CTM quando presentes nestes meios de diferenciação entram em uma cascata  
370 de desenvolvimento, começando a produção de fosfatase alcalina e expressão de  
371 proteínas de matriz óssea. Em vários modelos de culturas, a dexametasona constituinte  
372 do meio é capaz de induzir a diferenciação osteoblástica, enquanto o ácido ascórbico  
373 tem o papel de cofator na hidrolização de resíduos de prolina e de lisina no colágeno,  
374 causando um aumento da síntese de matriz proteica.

375

## 376 **CONCLUSÃO**

377 A associação dos dados obtidos em todas as etapas de cultivo e caracterização nos  
378 permite inferir que:

379 - o LLU continha células mononucleares capaz de gerar uma grande  
380 concentração de células para a cultura inicial, mesmo com uma pequena amostra de  
381 tecido;

382 - as células cultivadas cumpriram os requisitos estipulados pelo ISCT sendo  
383 aderentes em substrato plástico, diferenciando-se em meio osteogênico e adipogênico e  
384 apresentando perfil imunofenotípico condizentes com células tronco mesenquimais;

385 - o LLU representa uma fonte alternativa e viável de CTM.

386 **REFERÊNCIAS**

- 387 Alves, E.G.L. Células Tronco Mesenquimais de Cães Associadas ou Não à Vidro  
388 Bioativo, Diferenciação Osteogênica In Vitro e Tratamento de Defeito Ósseo  
389 Crítico. 2013. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo  
390 Horizonte. 108 p.
- 391 Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R. S. 2004. Adult mesenchymal stem cells:  
392 characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell.*  
393 *Mol. Med.* Vol 8, No 3, pp. 301-316.
- 394 Bilic, G.; Zeisberger, S. M.; Mallik, A. S.; Zimmermann, R.; Zisch, A. H. 2008.  
395 Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and  
396 mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant.* v. 17, n.  
397 8, 955-968, 2008.
- 398 Bittencourt, R. A. C.; Pereira, H. R.; Felisbino, S. L.; Murador, P.; Oliveira, A. P.  
399 E.; Deffune, E. 2006. Isolation Of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Acta*  
400 *Ortop Bras* 14(1).
- 401 Castania, V.A.; Volpon, J.B. 2007. Integração do enxerto ósseo corticoesponjoso  
402 homólogo, tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno: estudo em cães.  
403 *Revista Brasileira de Ortopedia.*, v.42, n.6, p.173-180.
- 404 Dominici, M.; Blanc, K. Le; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.;  
405 Krause, D. S.; Deans, R. J.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horwitz, E. M. 2006.  
406 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The  
407 International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n.  
408 4, p. 315–7.
- 409 Gargett, C.E. 2004. Stem cells in gynaecology. *Australian and Zealand Journal of*  
410 *Obstetrics and Gynaecology.* 44: 380-386.
- 411 Giordano, A.; Galderisi U.; Marino I.R. 2007.; From the laboratory bench to the  
412 patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal*  
413 *Cell Physiol.*, v. 211 (1), p. 27-35.
- 414 Grinfeld, S., Gomes, R. G. C. 2004. Células-tronco: um breve estudo. *International*  
415 *Journal Of Dentistry, Recife,* 3(1):324-329.
- 416 Gronthos, S.; Brahim, J.; Li, W.; Fisher, L.W.; Cherman, N.; Boyde, A.; DenBesten,  
417 P.; Robey, P. G.; Shi, S. 2002. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem  
418 Cells. *J DENT RES.* 81: 531.
- 419 Javazon, E.H.; Beggs, K.J.; Flake, A.W. 2004. Mesenchymal stem cells: paradoxes  
420 of passaging. *Experimental Hematology, Copenhagen,* v.32, n.5, p.414-425.

- 421 Jiang, H.; Qu, L.; Li, Y.; Gu, L.; Shi, Y.; Zhang, J.; Zhu, W.; Li, J. 2011. Bone  
422 marrow mesenchymal stem cells reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in  
423 rats. *Journal of Surgical Research*, v. 168, p. 127-134.
- 424 Jones, E.A.; Kinsey, S.E.; English, A.; Jones, R.A.; Straszynski, L.; Meredith, D.M.;  
425 Markham, A.F.; Jack, A.; Emery, P.; Mcgonagle, D. 2002. Isolation and  
426 characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells.  
427 *Arthritis e Rheumatism*, New Jersey, v.46, n.12, p.3349-3360.
- 428 Koch T.G.; Berg L.C.; Betts, D.H. 2008. Concepts for the clinical use of stem cells  
429 in equine medicine. *Can Vet J* 49:1009–1017.
- 430 Lima, S.A.F.; Wodewotzky, T. I.; Lima Neto, J. F.; Beltrão Braga, P. C. B.;  
431 Landim-Alvarenga, F. C.. 2012. Diferenciação in vitro de células-tronco  
432 mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. *Pesq. Vet.*  
433 *Bras.* 32(5):463-469.
- 434 Manieri, N. A.; Stappenbeck, T. S. 2011. Mesenchymal stem cell therapy of  
435 intestinal disease: are their effects systemic or localized? *Curr. Opin. Gastroenterol.*,  
436 v. 27, p. 119–124.
- 437 Meirelles, L.S.; Chagastelles, P. C.; Nardi, N. B. 2006. Mesenchymal stem cells  
438 reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. V. 119,  
439 p. 1177-1181, 2006.
- 440 Meirelles, L. S.; Caplan, A. L.; Nardi, N. B. 2008. In search of the in vivo identity  
441 of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 26, p. 2287-2299.
- 442 Monteiro, B. S.; Argôlo-Neto, N. M.; Nardi, N. B.; Chagastelles, P. C.; Carvalho, P.  
443 H.; Bonfá, L. P.; Filgueiras, R. R.; Reis, A.; Del Carlo, R. J. 2012. Treatment of  
444 critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. *Anais da*  
445 *Academia Brasileira de Ciência*, v. 84, p. 841-851.
- 446 Nakage A.P.M. 2005. Influencia do tipo de parto na hematologia do cordão  
447 umbilical de cães. *Ciencia Rural*, 35:377-380.
- 448 Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, M. J.; Behringer, R. R.;  
449 Crombrughe, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix  
450 is required for osteoblast differentiations and bone formation. *Cell*, v.108, p.17-29.
- 451 Nogueira, R.C. 2009. Isolamento, Caracterização e Análise da Estabilidade  
452 Citogenética Após Expansão In Vitro de Células Tronco Mesenquimais Derivadas  
453 do Epitélio Amniótico, Tecido Adiposo e Polpa de Dente Decíduo Humano.  
454 Dissertação (Pós Graduação). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de  
455 Santana, Bahia.

456 Olsson, D.C.; Pippi, N.L.; Martins, D.B; Tognoli, G. K.; Júnior, E. B. S.; Muller, D.  
457 C.; Lopes, S. T. A.; Marconato, F.; Morchbacher, P. D.; Teixeira, L. V. 2009.  
458 Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células  
459 mononucleares. *Cienc. Rural*, v.39, p.141-147.

460 Otsuka E.; Kato Y.; Hirose S.; Hagiwara H. 2000. Role of ascorbic acid in the  
461 osteoclast formation: Induction of osteoclast differentiation factor with formation of  
462 the extracellular collagen matrix. *Endocrinology*,141:3006-3011.

463 Payushina, O. V., Domaratskaya, E. I., Starostin, V. I. 2006. Mesenchymal Stem  
464 Cells: Sources, Phenotype, and Differentiation Potential. *Cell Biology*. Vol. 33, PP.  
465 2-18.

466 Pereira, I. et al. 2008. Protocolo piloto de separação e quantificação de células  
467 tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. *Acta ORL*, v.26,  
468 n.3, p.11-16.

469 Pereira, L.V. 2008. A importância do uso das células tronco para a saúde  
470 pública. *Ciênc. saúde coletiva* [online]. Vol.13, n.1, pp. 07-14. ISSN 1678-4561.

471 Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswak, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J.  
472 D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. 1999.  
473 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p.  
474 143-147.

475 Ribitsch, I.; Burk, J.; Dellling, U.; Geibler, C.; Gittel, C.; Julke, H.; Brhem, W. 2010.  
476 Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine.  
477 *Advances in Biochemical Engineering*, v.123, p. 219-63.

478 Strem, B.M.; Hicok, K. C.; Zhu, M.; Wulur, I.; Afonso, Z.; Schreiber, R. E.; Fraser,  
479 J. K.; Hedrick, M. H. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived  
480 stem cells. *Keio J Med*, v. 54, n. 3, p. 132-141.

481 Thomson, J. A., Itskowitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.;  
482 Marshall, V. S.; Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human  
483 blastocysts. *Science* 282 (5391): 1145-7.

484 Till, J.E.; Mcculloch, E.A., Siminovitch, L. 1964. A stochastic model of stem cell  
485 proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad*  
486 *Sci*. 51(1): 29-36.

487 Theise, N. D.; Krause, D. S. 2002. Toward a new paradigm of cell plasticity.  
488 *Leukemia*, v. 16, p.542-548.

489 Uranio, M.F. Et al. 2011. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular  
490 characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal

491 adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix.  
492 Mol. Reprod. Dev., v.1, p.1-13.

493 Vats, A.; Tolley, N. S.; Polak, J. M.; Buttery, L. D. K. 2002. Stem cells: sources and  
494 applications. Clin Otolaringol. 27: 227-234. 13.

495 Wan, C.D et al. 2008. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells  
496 derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model.  
497 Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, v.7, p.29-33. Disponível em: < h  
498 t t p : / / w w w . h b p d i n t . c o m / u p l o a d / P D F  
499 /200813193933152316.pdf>. Acesso em: 27 de janeiro de 2016.

500 Zucconi, E.; Vieira, N.M.; Bueno, D.F., Secco, M.; Jazedje, T.; Ambrosio, C.E.;  
501 Passos-Bueno, M.R.; Miglino, M.A.; Zatz, M. 2010. Mesenchymal stem cells  
502 derived from canine umbilical cord vein: A novel source for cell therapy studies.  
503 Stem Cells Dev. 19(3):395-402.

504