

ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA

ISOLATION OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS

RENATA APARECIDA DE CAMARGO BITTENCOURT¹, HAMILTON ROSA PEREIRA², SÉRGIO LUÍS FELISBINO³, PRISCILA MURADOR⁴, ANA PAULA EHRHARDT DE OLIVEIRA⁴, ELENICE DEFFUNE⁵

RESUMO

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Este trabalho teve como objetivo isolar as CTMs da medula óssea de camundongos utilizando dois diferentes meios de cultura e caracterizá-las através de imuno-marcação com anti-vimentina. Foram utilizados 6 camundongos BALB/c com 15 dias de idade. A medula óssea foi coletada do canal medular das tíbias e fêmures dos camundongos e ressuspensas em uma concentração final 6×10^6 , em meio Knockout-DMEM e DMEM alta concentração de glicose, suplementados com 10% SBF, mantidas em estufa a 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de CO₂ e 95% de ar por 72 horas, quando as células não aderentes foram removidas durante a troca do meio. O número e densidade de células com morfologia fibroblastóide foram maior no meio Knockout-DMEM em cinco dias de cultura versus 10-20 dias para conseguir a mesma concentração celular com o DMEM alta concentração de glicose. As células de ambos grupos apresentaram intensa marcação com anticorpo anti-vimentina, caracterizando-as como CTMs. A obtenção mais rápida das CTMs é fundamental para o campo da terapia celular, principalmente quando se deseja utilizar estas células no reparo de tecidos de origem mesenquimal.

Descritores: Células-Tronco; Cultura de Células; Camundongos; Medula óssea; Vimentina.

SUMMARY

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have a high ability to renew and differentiate themselves into various lineages of connective tissues. This study aimed to isolate the MSCs from murine bone marrow by using two different growth media and to characterize them with immunostaining with antivimentin antibody. We used six 2-week old BALB/c mice. Bone marrow was collected from mice's tibial and femoral channels and re-suspended in a final strength of 6×10^6 in Knockout-DMEM and high-glucose-DMEM media, supplemented by 10% FBS, and kept in a humidified 5% CO₂ incubator at 37° C for 72 h, when non-adherent cells were removed during the change of medium. The number and density of adherent fibroblast-like colonies was greater with the Knockout-DMEM medium (within 5 days of culture) versus 10-20 days in DMEM-high glucose to get the same cellular concentration. The cells in both groups were highly positive for antivimentin antibody, characterizing them as MSCs. Obtaining MSCs as quickly as possible is essential for cell therapy field, especially when those cells are intended to be used for the repair of tissues from mesenchymal sources.

Keywords: Stem Cells; Cell Culture; Mice; Bone Marrow; Vimentin.

INTRODUÇÃO

As células do estroma medular, também conhecidas como células-tronco mesenquimais ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas, são células tronco não-hematopoiéticas multipotentes que aderem a placas de cultura^(1,2).

As Células-Tronco Mesenquimais (CTM) da medula óssea têm a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular^(3,4). Estas células foram descritas primeiramente por Friedenstein et al.⁽⁵⁾, que descobriu que as CTMs aderem a placas de cultura, assemelham a fibroblastos "in vitro", e formam colônias^(1,6). Recentemente, as CTMs têm atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de

grande interesse para serem usadas no tratamento de diversas doenças humanas.

Muitos estudos têm isolado as CTMs e tem controlado, *in vitro*, a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e osso utilizando fatores de crescimento específico, com o objetivo de usar esta nova tecnologia no reparo de tecidos de origem mesenquimal lesados⁽⁷⁻⁹⁾.

A proposta deste estudo foi padronizar o melhor meio de cultura que deve ser empregado para isolar mais rapidamente as CTMs e caracterizá-las com a imunomarcação com anticorpo anti-vimentina, pois temos interesse em diferenciá-las "in vitro" em tecido cartilaginoso, para que este futuramente possa ser usado no reparo da cartilagem articular lesada.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro - UNESP - São Paulo - Brasil.

Endereço para correspondência: Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Hemocentro, Rubião Júnior s/n - E-mail: renatabit@zipmail.com.br

1 - Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia.

2 - Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Ortopedia.

3 - Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências

4 - Pesquisadora - Hemocentro.

5 - Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro.

Trabalho recebido em: 07/04/05 aprovado em 27/05/05

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi padronizar o meio de cultura que deve ser empregado para isolar mais rapidamente as CTMs e caracterizá-las com a imunomarcagem com anticorpo anti-vimentina.

MATERIAL E MÉTODOS

As CTMs foram coletadas da medula óssea de seis camundongos BALB/c com duas semanas de vida, procedentes do Laboratório Experimental de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os animais foram sacrificados como uma dose letal de pentobarbital sódico. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta universidade segundo o protocolo nº 345.

O meio de cultura testado foi o Knockout DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM; Catálogo nº 10829-018, Lote: 1209477) e DMEM-alta concentração de glicose (DMEM; Catálogo nº 12100-046, Lote: 1181947), suplementado com 10% de soro bovino fetal ([FBS] Catálogo nº 10270-106, Lote: 40Q3534K) e 10U/ml de penicilina G, 10ug/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B (Catalogo nº 15240-096, Lote: 1185890) todos obtidos da GIBCO® Invitrogen Corporation.

As CTMs foram coletadas da medula óssea dos fêmures e tíbias de três camundongos pela inserção de uma seringa de 26-gauge na cavidade do osso, lavando-a com 10 ml de Knock-out DMEM e DMEM-alta concentração de glicose nos outros três camundongos.

Após centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos, as células da medula óssea foram ressuspensas em 1mL nos respectivos meios de cultura para contagem de células e determinação da viabilidade celular utilizando-se a câmara de Neubauer. O número de células vitais foi determinado pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de trypan (GIBCO® Invitrogen Corporation), seguindo as recomendações de Freshney⁽¹¹⁾. Para

a contagem, foi utilizado 0,1mL da suspensão celular que, por sua vez, foi utilizado 0,1 mL de azul de trypan e 0,8 mL de meio de cultura. Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de pipeta de Pasteur e as células foram contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Para o cálculo do número de células foi utilizada a seguinte equação matemática: $NC \times D \times 10^4 / \#Q$, onde NC= número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (10) e #Q= número de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem das células. A viabilidade foi sempre maior que 95%, e o número de células plaqueadas foi 6×10^5 /placa.

Colocou-se uma lamínula dentro da placa de cultura para permitir que as células crescessem sobre ela para posteriormente analisá-las com anticorpo anti-vimentina. As culturas foram mantidas em

estufa a 37° C com 5% de CO² por 72h. Após 72h de cultura o meio foi trocado, e isto possibilitou a remoção das células não-aderentes da cultura. O meio de cultura foi trocado a cada três a quatro dias. Quando as células atingiram 80% de confluência, apresentando várias colônias fibroblásticas na placa, as lamínulas foram removidas da cultura e as células foram fixadas com 70% de etanol e lavadas duas vezes em 2mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7.4.

As lamínulas cultivadas foram tratadas com 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloquear as peroxidases endógenas. Depois foram incubadas seqüencialmente com 3% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), em PBS, e o anticorpo primário de camundongo anti-vimentina (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA). Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com anticorpo IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA). A reação de imunoperoxidase foi revelada com diaminobenzidina.

A média da área ocupada pelas células mesenquimais nas placas foi determinada pela medida de 10 campos ao acaso no aumento de 5X, de uma lâmina de cada camundongo doador. As medidas foram realizadas utilizando imagens digitalizadas, usando um analisador de imagens Leica Q-win software Version 3 for Windows™.

Os valores obtidos foram expressos como média ± desvio-padrão. Utilizou-se o test *t* de Student's não pareado, considerando significativo os resultados com índice de significância ($p \leq 0.05$). O teste estatístico foi realizado no Instat (versão 3.0, GraphPad, Inc., San Diego, CA).

RESULTADOS

As colônias de células com morfologia fibroblastóide começaram a aparecer nas placas de cultura em 72 horas com o meio

Knockout DMEM e 5 dias com o DMEM alta concentração de glicose. As células não-aderentes foram removidas da cultura durante a troca do meio. Após cinco dias de cultura, o número e densidade de colônias de células com morfologia fibroblastóide com o meio Knockout DMEM (Figura 1a) foram maior que com o DMEM alta concentração de glicose, que levou praticamente 10 dias para atingir a mesma concentração celular do primeiro meio (Figura 1b).

As células mantidas em cultura em ambos os protocolos foram positivas para anti-vimentina, caracterizando-as como CTMs. Após 10 dias, a placa de cultura que continha o meio Knockout DMEM ficou totalmente recoberta com as CTMs, como confirmada pela reação de anticorpo anti-vimentina (Figura 1c e 1d). Entretanto, a placa no qual foi usado o meio DMEM alta concentração de glicose não apresentou a mesma concentração celular (Figura 1e e 1f).

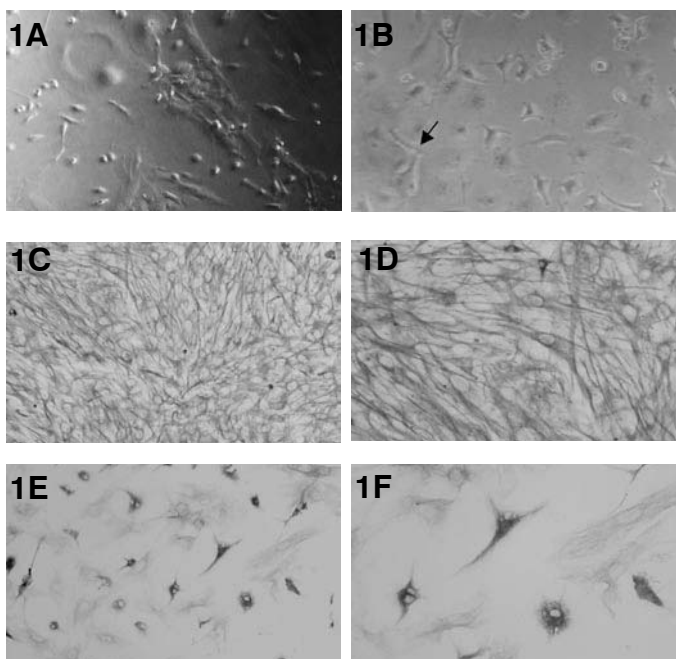


Figura 1- Microfotografia de contraste de fase das células mesenquimais em cultura (A-B). Presença de colônias de células com morfologia fibroblastóide em 5 dias de cultura com o meio Knockout DMEM (A) e no meio DMEM alta concentração de glicose, as células formaram colônias em 10 dias (B). Aumento: x400 respectivamente. Microfotografia de células tronco mesenquimais marcadas com anticorpo anti-vimentina (C-F). Observe a grande densidade celular com morfologia alongada cultivada no meio Knockout DMEM (C, D). A concentração celular foi menor com o meio DMEM alta concentração de glicose (E, F). Aumento: (C, E) x200 (D, F) x400.

A área média ocupada pelas células mesenquimais conforme analisada pela morfometria (Figura 2) foi aproximadamente 61,89%, com desvio-padrão de 18,64, para o Knockout DMEM versus 42,88%, com desvio-padrão de 8,81, para o DMEM-alta concentração de glicose, com um $p < 0,01$, apresentando um resultado estatisticamente significativo.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que é possível obter as CTMs em um curto espaço de tempo usando o meio de cultura Knockout DMEM. Isto foi possível devido a sua propriedade de ser utilizado especificamente em células tronco embrionárias. Em outros trabalhos foi realizada a cultura de CTMs com DMEM baixa concentração de glicose, e os autores obtiveram somente de depois de 5 dias as primeiras colônias aderentes de células com morfologia fibroblastóide^(4,10). Neste presente estudo, observamos uma diferença significativa entre os dois meios de cultura, e essas diferenças foram mais

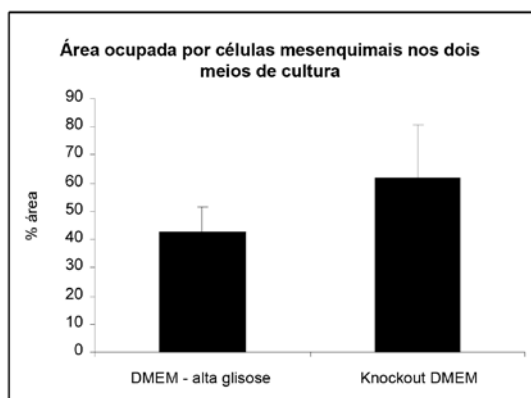


Figura 2 - Comparação dos efeitos entre os dois meios de cultura na área ocupada pelas células mesenquimais. Os valores representam a média \pm desvio-padrão. As células cultivadas no meio Knockout DMEM ocuparam uma área na placa que foi aproximadamente 50% maior que as cultivadas no meio DMEM alta concentração de glicose, com diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$.

evidentes quando as células foram marcadas com o anticorpo anti-vimentina.

CONCLUSÕES

1. O uso dos dois meios permitiu demonstrar a superioridade do Knockout DMEM que produziu um grande número de células quando comparado aos valores obtidos quando se usou o DMEM alta concentração de glicose.

2. O uso do meio Knockout DMEM poderá ser uma outra alternativa para o isolamento mais rápido das CTMs em cultura, principalmente quando se deseja diferenciá-las em outros tecidos de linhagem mesenquimal, como a cartilagem.

Agradecimentos:

Agradecemos à técnica Sra. Fátima

Regina Guimarães do Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela excelente assistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Javason EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stroma cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; 19:219-25.
2. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20:249-58.
3. Campagnoli C, Roberts AG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98:2396-402.
4. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21:105-10.
5. Friedenstein AJ, Deriglazova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2:83-92.
6. Johnstone B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. *Eur Cells Mater* 2002; 4 (Suppl 1):1473-2262.
7. Martin I, Padera RF, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthop Res* 1998; 16:181-9.
8. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Hematol* 2003; 123:702-11.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
10. Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jiang CC. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* 2003; 21:190-9.
11. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3rd. Ed. New York: Wiley-Liss, 2001.