

Método imunomagnético associado ao meio MesenCult® na obtenção de células mononucleares da medula óssea de coelhos negativos para o anticorpo monoclonal CD45¹

Luiz A. de Souza^{2*}, Luiz A.F. da Silva², Benito J.N.A de Oliveira³, Elisângela de P.S. Lacerda⁴, Marcelo E. Beletti⁵, Aliny P. de Lima⁶, Tais Andrade Dias⁷ e Duvaldo Eurides⁸

ABSTRACT.- Souza L.A., Silva L.A.F., Oliveira B.J.N.A., Lacerda E.P.S., Beletti M.E., Lima A.P., Dias T.A. & Eurides D. 2016. [Immunomagnetic method associated with MesenCult® medium to obtain bone marrow mononuclear cells from rabbits negative for CD45 monoclonal antibody.] Método imunomagnético associado ao meio MesenCult® na obtenção de células mononucleares da medula óssea de coelhos negativos para o anticorpo monoclonal CD45. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(4):339-344. Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Avenida Esperança s/n, Campus Samambaia, Goiânia, GO 74690-900, Brazil. E-mail: souza_vet@yahoo.com.br

The objective of this study was to describe guidelines for the isolation of bone marrow mononuclear cells from rabbits, followed by cell purification by negative depletion with CD45 monoclonal antibody, and further expansion in MesenCult® medium. Ten adult male New Zealand White rabbits, age average of 1.0±0.2 years and weighting 3.5±0.24kg, were used to obtain a standardized method. The mononuclear cells of the bone marrow were isolated with Ficoll-paque® density gradient centrifugation, and the cell purification and acquisition was completed by negative depletion with CD45 monoclonal antibody in immunomagnetic base. The cell population obtained was expanded in MesenCult® medium. Through isolation with Ficoll-paque® density gradient was possible to obtain an average yield of 7.31x10⁶ cells/mL. After purification and acquisition of potential mesenchymal stem cells by the immunomagnetic base, there was a yield decrease to 2.28x10⁶ cells/mL; however the expansion process was increased in cell culture. The results indicated that cells obtained from the mononuclear fraction of bone marrow and cultivated in vitro were capable to generate adherent cells 24 hours after culture, with predominance of fibroblastoid cells suggestive of mesenchymal stem cells. It can be concluded that mesenchymal stem cells can be achieved with purified rabbit bone marrow mononuclear cells through the immunomagnetic method, as the MesenCult® medium provides a suitable environment for a quick in vitro expansion, and the number of passages exerts negative influence on the morphological characteristics.

INDEX TERMS: Mesenchymal stem cells, lagomorph, immunomagnetic separation.

¹ Recebido em 17 de fevereiro de 2015.

Aceito para publicação em 18 de janeiro de 2016.

² Docente do Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, Rodovia Goiânia-Nova Veneza, Cx. Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brasil. *Autor para correspondência: souza_vet@yahoo.com.br

³ Doutor em Ciência Animal pela EVZ-UFG, Campus Samambaia, Rodovia Goiânia-Nova Veneza, Cx. Postal 131, Goiânia, GO 74001-970.

⁴ Docente do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e Coordenadora do Laboratório de Genética e Citogenética da UFG, Campus Samambaia, ICB I, Sala 200, Goiânia, GO 74001-970.

⁵ Docente do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG 38400-900, Brasil.

⁶ Doutoranda do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFG, Campus Samambaia, Laboratório de Genética Molecular e Citogenética. ICB I, Sala 200, Goiânia, GO 74001-970.

⁷ Doutoranda em Ciência Animal, EVZ-UFG, Campus Samambaia, Rodovia Goiânia-Nova Veneza, Cx. Postal 131, Goiânia, GO 74001-970.

⁸ Docente do Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Umuarama, Bloco 2T, Av. Pará 1720, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG 38400-900.

RESUMO. O objetivo deste artigo é de descrever um protocolo de isolamento das células mononucleares da medula óssea de coelhos, seguido de purificação celular por depleção negativa com o anticorpo monoclonal CD45 e posterior expansão em meio de cultura MesenCult®. Dez coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia, com idade média de $1,0 \pm 0,2$ anos e peso médio $3,5 \pm 0,24$ kg, foram utilizados para padronização da metodologia. O isolamento das células mononucleares da medula óssea foi realizado pelo gradiente de densidade Ficoll-paque® e a purificação e obtenção das células- pela depleção negativa com o anticorpo monoclonal CD45 em base imunomagnética. A população celular obtida foi expandida posteriormente em meio de cultura MesenCult®. No isolamento pelo gradiente de Ficoll-Paque® foi obtido um rendimento médio de $7,31 \times 10^6$ células/mL. Após purificação e obtenção das possíveis células-tronco mesenquimais pela base imunomagnética, houve um decréscimo do rendimento para $2,28 \times 10^6$ células/mL, mas o processo de expansão foi incrementado pelo cultivo celular. Os resultados indicaram que as células obtidas da fração mononuclear da medula óssea, cultivadas *in vitro* foram capazes de gerar células aderentes 24 horas após o cultivo, com predominância de células fibroblastóides sugestivas de células-tronco mesenquimais. Concluiu-se que a obtenção de células-tronco mesenquimais pode ser alcançada após purificação das células mononucleares da medula óssea de coelhos pelo método imunomagnético, o meio de cultura MesenCult® proporciona um ambiente adequado para a rápida expansão *in vitro* e o número de passagens exerce influência negativa sobre as características morfológicas das células.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Células-tronco mesenquimais, lagomorpha, separação imunomagnética.

INTRODUÇÃO

As pesquisas científicas com células-tronco fundamentam-se na expectativa destas unidades teciduais revolucionarem as terapêuticas convencionais de enfermidades que cursam com morte celular. O termo “células-tronco”, do inglês *stem cell* corresponde a células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e autorrenovação ilimitadas, podendo originar uma variedade de tecidos. Portanto, acredita-se que essas células tenham papel regenerativo em lesões ou injúrias (Bydlowski et al. 2009).

As células-tronco mesenquimais são facilmente coletadas de organismos adultos e suas características regenerativas criaram expectativas de uso em terapias celulares. Diferentes métodos de obtenção associados a protocolos de isolamento e cultivo de células mesenquimais já foram utilizados com sucesso, mas todos envolvem uma etapa inicial de separação de células mononucleares por meio de gradiente de densidade Ficoll-Paque® (Eurides et al. 2010, Maciel et al. 2014, Letouzey et al. 2015). Apesar dos resultados positivos, Maciel et al. (2014) e Letouzey et al. (2015) relataram dificuldades no cultivo e manutenção dessas células *in vitro*. Para expansão, é necessário isolá-las e purificá-las, sendo que ao se multiplicarem em cultura, caracterizam-se por apresentarem aderência ao plástico, ter aspecto de

fibroblastos e se diferenciar em células distintas (Yu et al. 2004). Após o isolamento e expansão podem se diferenciar em osteoblastos (Kassel, Roskilde & Erikson 1993), músculo esquelético (Sampaolesi et al. 2005), endotélio (Abe et al. 2004), cardiomiócitos (Lima, Soares & Santos 2009), hepatócitos (Justesen et al. 2002), adipócitos (Jiang et al. 2002), tecido tendíneo (Kwan, Wan & Longaker 2003) e neurônios (Mendez-Otero et al. 2009).

Pesquisas envolvendo o isolamento, a expansão celular e posterior aplicação *in vivo* podem ser uma alternativa eficaz para o tratamento de doenças ou lesões críticas, crônicas e degenerativas. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a obtenção e expansão *in vitro* das células-tronco mesenquimais obtidas da fração mononuclear da medula óssea de coelhos após separação imunomagnética e expansão em meio MesenCult®, para futura aplicação *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita da medula óssea e isolamento das células mononucleares

O estudo foi desenvolvido na Escola de Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o protocolo nº 134/11.

Dez coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia, com idade média de $1,0 \pm 0,2$ anos e peso médio $3,5 \pm 0,24$ kg, foram utilizados para padronização da metodologia de colheita, isolamento, purificação e cultivo de células mononucleares negativas para o anticorpo monoclonal CD45. Após o uso do protocolo pré-anestésico composto por 2,0mg/kg de cloridrato de tramadol e 0,05mg/kg de acepromazina por via intramuscular, procedeu-se a indução anestésica com associação de 30mg/kg cetamina e 5,0mg/kg xilazina pela mesma via para realização da tricotomia e antisepsia das regiões escápulo-umerais. Em seguida, a colheita medular foi realizada por meio de uma agulha metálica de Rosenthal (16 gauge) heparinizada, inserida no tubérculo maior do úmero e aspirados 8,0mL de medula óssea íntegra de cada animal com auxílio de uma seringa de 10mL, contendo 0,3mL de solução estéril de heparina com 5000 U/mL.

Em capela de fluxo laminar, os aspirados de cada animal foram divididos em quatro amostras acondicionadas em tubos cônicos estéreis de 15mL. Cada amostra foi diluída em 2,0mL de solução salina tamponada (DPBS®), acrescida de soro fetal bovino (SFB) a 10% e 10mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético). Em seguida, foram depositadas sobre 2,0mL de solução Ficoll-paque® (Amersham Biosciences, São Paulo, SP, Brasil) na densidade de 1,077g/mL contida em outros tubos. As quatro soluções resultantes de cada animal foram centrifugadas a 495xg durante 30 minutos a 15°C.

As amostras foram separadas em quatro porções distintas: plasma, nuvem celular, Ficoll-paque® e células vermelhas. O sobrenadante composto pelo plasma foi removido com auxílio de uma pipeta Pasteur das quatro amostras referentes a cada animal e as nuvens celulares formadas sobre a solução de Ficoll-paque® transferidas para um único tubo cônico estéril de 15mL. O tubo foi centrifugado a 385 x g durante dez minutos a 4°C por mais duas vezes com 10mL de DPBS e, uma vez, com 10mL de meio de cultivo (MesenCult® MSC, Basal Medium Human, StemCell™, Vancouver, Canadá) suplementado com 10% de SFB. Em seguida, o meio foi desprezado permanecendo aderido no fundo do tubo apenas o aglomerado de células mononucleares.

Determinação do rendimento e da viabilidade das células mononucleares

O sedimento contendo células mononucleares aderido no fundo dos tubos foi ressuspensionado em 2,0mL de meio MesenCult® para determinação do rendimento e da viabilidade celular pela técnica de exclusão vital por azul de Tripan. Uma alíquota de 10µL da suspensão foi adicionada a 10µL do corante azul de Tripan 0,4% em um microtubo de 200µL (Eppendorf®, São Paulo, SP) para contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer. A contagem celular foi realizada sob microscopia de luz a partir de uma alíquota de 10µL da solução resultante (células e corante) e o cálculo do número de células por mililitro foi determinado pela seguinte fórmula: $V \times FN \times FT / \#Q$, onde V = número de células viáveis contadas; FN = fator da câmara de Neubauer (10^4); FT = fator de diluição do azul de Tripan (2) e $\#Q$ = número de quadrantes da câmara utilizados para a contagem.

Obtenção das células mononucleares negativas para o anticorpo monoclonal CD45 em base imunomagnética

Após o isolamento das células mononucleares da medula óssea pelo gradiente de densidade Ficoll-Paque®, as células mononucleares da medula-óssea negativas para o CD45 contidas nessa fração foram obtidas a partir de um ensaio imunomagnético caracterizado pela depleção negativa das células hematopoiéticas, utilizando o anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, complexo tetramérico e nanopartículas magnéticas (Easy Sep, StemCell® Vancouver, Canadá). Inicialmente foi adicionado na amostra de células mononucleares um anticorpo monoclonal composto por imunoglobulina G (IgG1) de camundongo a 5%, permanecendo por cinco minutos. Na sequência, adicionou-se 20µL do anticorpo CD45 com repouso de 15 minutos e 20µL das nanopartículas magnéticas. A amostra foi acondicionada em tubo de poliestireno e acrescida de tampão fosfato-salino suplementado com 10% de SFB e EDTA até o volume final de 2,5mL. Inserido na base magnética, o tubo permaneceu por dez minutos e em seguida foi vertido em um novo tubo cônico de 15mL, onde foram depositadas apenas as células negativas para CD45 para nova contagem de rendimento. Procedeu-se a comparação entre o número de células viáveis obtidas nos dois momentos distintos, ou seja, após isolamento das células mononucleares com utilização de Ficoll-Paque® e pelo ensaio imunomagnético caracterizado pela depleção negativa das células positivas para o CD45, indicativo de linhagens hematopoiéticas.

Expansão celular in vitro das células mononucleares negativas para o anticorpo monoclonal CD45

As células isoladas pelo ensaio imunomagnético, foram semeadas em frascos de poliestireno de 25cm³ a uma densidade de 5×10^5 células imersas em meio MesenCult® suplementado com SFB a 10%, 50µg/mL de gentamicina e 2µg/mL de anfotericina B, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. Após 72 horas da primeira semeadura, o meio de cultura presente nos frascos foi removido a fim de eliminar as células não aderentes, e selecionar as células mononucleares negativas para o anticorpo monoclonal CD45 por meio da aderência ao plástico. O meio foi substituído a cada três dias e o crescimento das células aderentes, a confluência e morfologia das colônias avaliadas diariamente em microscópio invertido.

Passagens ou repiques das culturas

Após atingirem confluência entre 80% e 90% foram realizadas as passagens possibilitando transferência dessas células para outros frascos de cultivos. As passagens foram realizadas após o uso de enzima proteolítica para que as células cultivadas perdessem a adesão ao plástico. Para isso, o meio de cultura foi removido

e as células lavadas com solução de PBS. Após o descarte da solução, foi acrescentado 3,0mL de tripsina/EDTA a 0,25% e 3,0mL PBS, com o objetivo de recobrir toda a monocamada de células aderidas. As amostras foram incubadas a 37°C por três minutos e, logo após, visualizadas em microscópio óptico invertido para a confirmação da perda de adesão ao plástico. A ação da tripsina foi paralisada depois da adição de 3,0mL de meio MesenCult® suplementado com SFB a 10%.

Posteriormente, as células contidas nos frascos foram transferidas para novos tubos cônicos e centrifugadas a 1.200rpm por 10 minutos a 15°C. As células aderidas no fundo dos tubos foram ressuspensionadas em 2,0mL de meio MesenCult® e retirou-se uma alíquota de 10µL para determinação do rendimento celular pós-cultivo e avaliação da viabilidade por meio da exclusão vital pela coloração de Tripan. A cada passagem celular era realizada uma nova contagem total das células e a avaliação da viabilidade. Para visualização das colônias fibroblastóides em microscópio óptico, uma alíquota de 200 µL de cada amostra cultivada das células negativas para CD45 foi fixada em lâminulas com formalina 4% e coradas pela técnica de Giemsa por 30 minutos em temperatura ambiente.

Conforme o número de repiques e os rendimentos encontrados, as células eram subcultivadas em garrafas de até 150cm³ com densidade de 1×10^6 células. Os valores das médias e dos desvios padrão foram utilizados para analisar o rendimento e a viabilidade celular das células mononucleares após o processo de isolamento por gradiente de densidade Ficoll-Paque® e das células mononucleares da medula-óssea negativas para o CD45, obtidas das frações mononucleares após purificação em base imunomagnética. Apesar de não terem sido realizadas análises fenotípicas e de diferenciação celular, conforme critérios estabelecidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*, sugere-se que essa população celular corresponde as células-tronco mesenquimais (CTM's).

RESULTADOS

A colheita do material medular através do tubérculo maior do úmero foi dependente do protocolo anestésico e não apresentou dificuldade para obtenção de um volume expressivo com apenas uma punção. A heparinização das seringas e agulhas facilitou o procedimento da colheita e a proporção de anticoagulante e volume medular não comprometeu o rendimento e a viabilidade das amostras.

O gradiente Ficoll-Paque® foi eficaz no isolamento das células mononucleares de coelhos, comprovado pela formação do anel celular após o processo de centrifugação. A média e o desvio padrão [$\pm dp$] das células mononucleares quantificadas após isolamento em gradiente de densidade Ficoll-Paque® foram de $7,31 [\pm 4,03] \times 10^6$ células/mL com variação de $1,06 \times 10^6$ a $13,70 \times 10^6$ células/mL. A viabilidade esteve entre 94,67% e 99,46%, com média de 97,15% [$\pm 1,47$]. Após serem submetidas à purificação em base imunomagnética para obtenção das células mononucleares da medula-óssea negativas para o CD45 ou CTM's as amostras apresentaram rendimentos inferiores entre $0,22 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ células/mL com rendimento médio de $2,28 [\pm 1,45] \times 10^6$ células/mL e viabilidade média de 97,77% [$\pm 1,63$], variando entre 94,67% e 100% de células viáveis. Apesar da padronização do volume medular colhido, foram encontrados diversos valores de rendimento e viabilidade celular para cada animal (Fig.1).

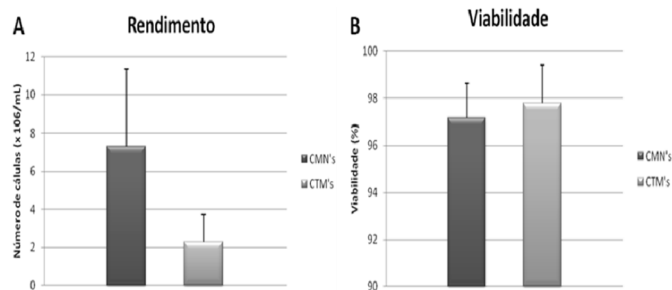


Fig.1. Representação gráfica (A) do rendimento médio e (B) da viabilidade celular referentes a 8,0mL do aspirado medular de dez coelhos, após as células mononucleares (CMN's) serem isoladas pelo gradiente Ficoll-Paque® e purificadas em base imunomagnética para obtenção das células-tronco mesequimais (CTM's). As barras representam o desvio padrão.

A técnica de separação celular com microesferas magnetizadas em associação ao anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, permitiu a seleção negativa das células hematopoiéticas, sendo removidas seletivamente pelo campo magnético. Diante dos resultados obtidos, é possível inferir que a separação imunomagnética foi eficaz, uma vez que 30% do total das células mononucleares isoladas pelo método de gradiente Ficoll-Paque® eram compostas por CTM's. O baixo rendimento de $2,28 \pm 1,45 \times 10^6$ células/mL após a purificação da fração mononuclear foi compensado pela expansão *in vitro*, obtendo uma população celular padronizada com menor número de subcultivos possíveis. A expansão utilizando o meio de cultura MesenCult® proporcionou amplificação em 60% no momento da segunda passagem quando comparado com o número de células semeadas na primeira, intensificando o rendimento celular conforme eram realizados subcultivos até a 10ª passagem.

As células obtidas da fração mononuclear da medula óssea foram capazes de gerar células com diferentes morfologias logo após o início do cultivo, tempo necessário para que as células aderissem ao plástico e formassem uma matriz de ancoragem responsável pela sua sobrevivência e proliferação. Entre a população celular encontrada, células alongadas de aspecto fibroblastóide foram predominantes, no entanto, células ovais, bem como a formação de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F) também foram observadas. As células que permaneceram aderidas ao frasco de cultura constituíram uma população rara da medula óssea e apresentaram elevada capacidade replicativa, principalmente as caracterizadas pelas colônias de densidade e formato irregulares.

Após a segunda passagem, houve predominância de células com características fibroblastóides resultando em uma cultura homogênea em diferentes fases de desenvolvimento (Fig.2A-D) e em alguns casos, presença de grandes células arredondadas e multinucleadas. A técnica de coloração por Giemsa favoreceu a visualização das colônias fibroblásticas e do aspecto fibroblastóide das células no 3º dia após a semeadura (Fig.2E,F).

O meio de cultura empregado foi considerado fundamental no processo de expansão celular e a escolha do MesenCult® fundamentou-se no fato desse meio ser

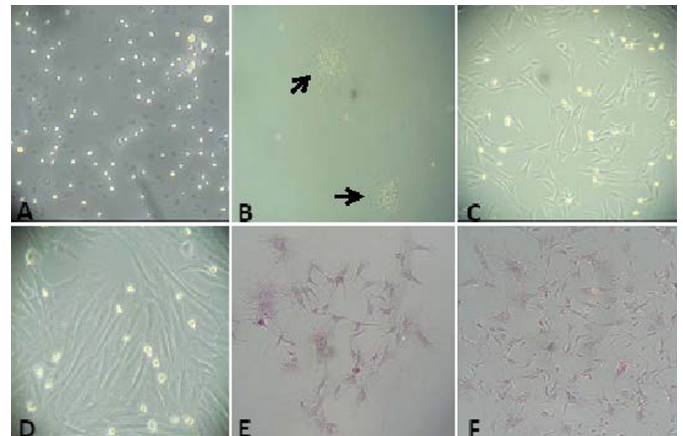


Fig.2. Células-tronco mesenquimais aderentes provenientes da medula óssea de coelhos cultivadas em meio de cultura MesenCult®. (A) Células-tronco mesenquimais no dia 0. (B) Unidades formadoras de colônias fibroblásticas (setas). (C) Início de confluência das células fibroblastóides no 3º dia. (D) Células fibroblastóides confluentes no 10º dia de cultivo. (E,F) Coloração pela técnica de Giemsa, 40x.

empregado com sucesso para cultura de células-tronco mesenquimais humanas e utilizado de forma eficaz para enumeração de colônias CFU-F. O meio ainda resultou em rápida expansão *in vitro* e a redução significativa das células hematopoiéticas remanescentes nas passagens iniciais. Além disso, a suplementação com soro fetal bovino a 10%, a adição de antimicrobianos e antifúngicos para manutenção e propagação celular foram medidas importantes no processo, pois em ensaios preliminares notou-se que em culturas livres de soro não ocorria proliferação celular.

As submissões das culturas à várias etapas de tripsinização para expansão e subdivisão possibilitaram a permanência em cultivo por períodos que variaram de dois a três meses. No entanto, as CTM's, apresentaram características morfológicas de células inviáveis, por meio da observação de vacúolos a partir da 10ª passagem. Durante a padronização da técnica, um dos pontos críticos no cultivo celular foi o tempo de atuação da tripsina no momento do subcultivo, uma vez que o aumento do tempo de ação diminuiu a viabilidade celular da cultura.

DISCUSSÃO

Durante o procedimento de colheita do material medular preconizou-se única punção medular; no entanto Gridem et al. (2002) recomendaram diversas punções na crista ilíaca e no trocânter maior do fêmur para se obter um volume medular satisfatório, o que não foi necessário neste estudo. Apesar de alguns autores como Muschler et al. (1997) e Yanai et al. (2005) em seus trabalhos não determinarem o volume adequado do anticoagulante, admitiram que valores inadequados podem lesar as células medulares. No presente estudo optou-se por padronizar uma proporção adequada entre o anticoagulante e o volume medular a fim de evitar alta taxa de mortalidade celular.

Apesar da standardização do volume medular para cada amostra, houve grande variabilidade em relação ao rendimento e viabilidade entre os animais. Essa diferença

pode ter sido influenciada pela diluição com o sangue periférico. No entanto, fatores intrínsecos e extrínsecos, microambiente, manipulação das células e da variação individual de cada espécie também podem ter influenciado, possibilidades também apontadas por Oliveira et al. (2011).

Após expansão em cultura, Forriol & Esparza (2008) encontraram percentagens de células-tronco mesenquimais semelhantes às apresentadas nesse experimento, mas Mazzetti et al. (2010), cultivando células do tecido adiposo de coelhos em meio DMEM, conseguiram incrementar o rendimento em 77% após a segunda passagem no vigésimo dia. Resultados expressivos, porém tardios, pois a partir do décimo dia de cultivo já era possível descrever rendimentos equivalentes no presente estudo.

Foi possível observar células aderentes nas primeiras 24 horas de cultivo, no entanto, Romanov et al. (2003) conseguiram células aderentes apenas a partir do quinto dia, aplicando meio de cultivo diferente. Segundo Mori et al. (2005) esses tipos celulares são capazes de formar tecido *in vivo*, mesmo após terem sido extensivamente cultivados *in vitro*. Assim, condições fundamentais como o meio de cultura, densidade celular de semeadura, tratamento com diferentes doses de antimicrobianos e antifúngicos e suplementação com soro fetal bovino a 10% são necessárias para o desenvolvimento de uma boa cultura. Caso a expansão se torne inviável, a posterior aplicação das células em estudos *in vivo* poderá ser prejudicada, segundo Kasten et al. (2008).

Na literatura consultada (Yanai et al. 2005, Mazzetti et al. 2010) não houve relato do uso de MesenCult® na expansão de células obtidas da medula óssea de coelhos. Portanto, ainda que o meio não contenha componentes de origem animal, os resultados apresentados indicam a eficácia na metodologia, uma vez que o crescimento e o potencial celular de diferenciação foram mantidos. As culturas foram submetidas à tripsinização no intuito de aumentar o rendimento celular e possibilitar a permanência em cultivo por longos períodos. Tal conduta promoveu gradativamente a redução do potencial de renovação dessas células, corroborando com os achados de Kawasaki-Oyama et al. (2008). Já Freshney (2006) relatou que as passagens celulares podem ser realizadas inúmeras vezes, sem comprometer o rendimento e a viabilidade do cultivo celular.

O tempo considerado ideal para o tratamento enzimático por tripsina/EDTA a 0,25% foi de três minutos, resultados divergentes aos encontrados. Manso et al. (2002) e Silveira et al. (2010) empregaram a tripsina com tempos que variaram entre dois, cinco e dez minutos e não observaram diferenças em relação ao rendimento e viabilidade celular da cultura entre o primeiro e o segundo subcultivo.

Embora não tenham sido utilizados marcadores específicos para células-tronco mesenquimais e indução de diferenciação celular para confirmação da presença de células-tronco, a intensa proliferação observada nas amostras foi um indicativo da presença dessas células. Esse argumento encontra respaldo no fato de as células diferenciadas ou senescentes possuírem um tempo de vida limitado, caracterizado pela perda da capacidade de proliferação e estagnação da cultura, corroborando com Bieback et al. (2004).

A aderência das células mononucleares da medula-óssea negativas para o CD45 isoladas à superfície plástica e sua morfologia fibroblástica sugeriu a presença das CTM's na cultura, de acordo com o padrão para identificação desse tipo celular.

Apenas alguns autores (Baksh, Davies & Zandstra 2003, Miranville et al. 2004, Martin et al. 2010) fizeram referência ao método imunomagnético de separação celular, mas não citaram o seu uso em coelhos, aspecto que valoriza os dados apresentados. Deste modo, os resultados *in vitro* obtidos no presente experimento, estão de acordo com os encontrados por Keller et al. (2003) e incrementam o desenvolvimento de modelos *in vivo*, permitindo uma exploração mais acurada da relação entre as propriedades dos materiais e suas respostas biológicas quando associados às células negativas para o anticorpo monoclonal CD45 (Senegaglia et al. 2009).

A obtenção de CTM'S pode ser alcançada após purificação das células mononucleares da medula óssea de coelhos pelo método imunomagnético e o meio de cultura MesenCult® proporciona um ambiente adequado para a rápida expansão *in vitro*, no entanto o número de passagens exerce influência negativa sobre as características morfológicas das células principalmente após a 10ª passagem.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

REFERÊNCIAS

- Abe S., Boyer C., Liu X., Wen F.Q., Kobayashi T., Fang Q., Wang X., Hashimoto M., Sharp J.G. & Rennard S.I. 2004. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170:1158-1163.
- Baksh D., Davies J.E. & Zandstra P.W. 2003. Adult human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp. Hematol.* 31:723-732.
- Bieback K., Susanne K., Kluter H. & Eichler H. 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22:625-634.
- Bydlowski S.P., Debes A.A., Maselli L.M.F. & Janz F.L. 2009. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revta Bras. Hematol. Hemoter.* 31(Supl.1):25-35.
- De Vita B., Campos L.L., Listoni A.J., Maia L., Sudano M.J., Curcio B.R., Landim-Alvarenga F.C. & Prestes N.C. 2013. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells derived from equine amniotic fluid obtained from different gestational ages. *Pesq. Vet. Bras.* 33:535-542.
- Eurides D., Oliveira B.J.N.A., Souza L.A., Silva L.A.F., Daleck C.R. & Freitas P.M.C. 2010. Obtenção de células mononucleares da medula óssea pela punção do tubérculo umeral de coelhos. *Ars Vet.* 26:71-76.
- Forriol F. & Esparza R. 2008. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales em cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma Fund. MAPFRE* 19:88-101.
- Freshney R.I. 2006. *Basic Principles of Cell Culture: culture of cells for tissue engineering.* John Wiley and Sons. 322p.
- Gridem C.B., Neel J.A. & Juopperi T.A. 2002. Cytology of bone marrow. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 32:1313-1374.
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzales X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A. & Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.

- Justesen J., Stenderup K., Eriksen E.F. & Kassem M. 2002. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif. Tissue Int.* 71:36-44.
- Kassel M., Roskilde L. & Erikson E.F. 1993. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluorid-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* 8:1453-1458.
- Kasten P., Beyen I., Egermann M., Suda A.J., Moghaddam A.A., Zimmermann G. & Luginbühl R. 2008. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *Eur. Cell Mat.* 23:47-55.
- Kawasaki-Oyama R.S., Braile D.M., Caldas H.C., Leal J.C.F., Bertollo E.M.G., Bertelli E.C.P., Filho M.A. & Santos I. 2008. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. *Revta. Bras. Cirur. Cardiovasc.* 23:29-34.
- Keller J.C., Schneider G.B., Stanford C.M. & Kellogg B. 2003. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dentistry* 12:175-181.
- Kwan D.M., Wan D.C. & Longaker M.T. 2003. Skeletal Tissue Engineering, p.935-944. In: Lanza R., Langer R. & Vacanti J. (Eds), *Principles of Tissue Engineering*. 3rd ed. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Letouzey V., Tan K.S., Deane J.A., Ulrich D., Gurung S., Ong Y.R. & Gargett C.E. 2015. Isolation and characterization of mesenchymal stem/stromal cells in the ovine endometrium. *PLoS One* 10:1-17.
- Lima R.S., Soares M.B.P. & Santos R.R. 2009. Terapia celular na doença de Chagas. *Revta Bras. Hematol. Hemoter.* 31(Supl.1):87-92.
- Maciel B.B., Rebelatto C.L.K., Brofman P.R.S., Brito H.F.V., Patricio L.F.L., Cruz M.A. & Locatelli-Dittrich R. 2014. Morphology and morphometry of feline bone marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. *Pesq. Vet. Bras.* 34:1127-1134.
- Manso M., Ogueta S., Pérez-Rigueiro J., García J.P. & Martínez-Duart J.M. 2002. Testing biomaterials by the in-situ evaluation of cell response. *Biomol. Engineer.* 2(6):239-242.
- Martin F.T., Dwyer R.M., Kelly J., Khan S., Murphy J.M., Curran C., Miller N., Hennessy E., Dockery P., Barry F.P., O'Brien T. & Kerin M.J. 2010. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res. Treat.* 124:317-326.
- Mazzetti M.P.V., Oliveira I.S., Ferreira R.M., Fauaz G., Ribeiro C.N., Gomes P.O., Pontes P., Ferreira A.T. & Eça L.T. 2010. Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. *Acta Cir. Bras.* 25:24-27.
- Mendez-Otero R., Guimarães A.G., Coelho P.M.P. & Freitas G.R. 2009. Terapia celular no acidente vascular cerebral. *Revta Bras. Hematol. Hemoter.* 31(Supl.1):99-103.
- Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C.A., Busse R. & Bouloumié A. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue derived stem cells. *Vasc. Med.* 110:349-355.
- Mori H., Kanemura Y., Onaya J., Hara M., Miyake J., Yamasaki M. & Kariya Y. 2005. Effects of heparin and its 6-O-and 2-O-desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells. *J. Biosci. Bioengineer.* 100:54-61.
- Muschler G.V., Boehm C. & Easley K. 1997. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J. Bone Joint Surg.* 79a:1699-1709.
- Oliveira B.J.N.A., Souza L.A., Eurides D., Silva L.A.F., Baungarten L.B. & Busnardo C.A. 2011. Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejos. *Acta Bioquim. Clin. Latin.* 45: 11-38.
- Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A. & Smirnov V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSClike cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21:105-110.
- Sampaolesi M., Biressi S., Tonlorenzi R., Innocenzi A., Draghici E., Cusella A.M.G. & Cossu G. 2005. Cell therapy of primary myopathies. *Arch. Ital. Biol.* 143:235-242.
- Senegaglia A.C., Rebelatto C.L.K., Suss P.H. & Brofman P.R.S. 2009. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano. *Revta Bras. Hematol. Hemoter.* 31(Supl.1):9-14.
- Silveira R.F.M., Ferreira L.C., Ginani F. & Barboza C.A.G. 2010. Influência do protocolo laboratorial no rendimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais. *Revta Ciênc. Méd. Biol.* 9:721.
- Yanai T., Ishii T., Chang F. & Ochiai N. 2005. Reparo de amplos defeitos de espessura completa da cartilagem articular em coelhos: os efeitos da distração do joelho e transplante autólogo de células mesenquimais derivadas da medula óssea. *J. Bone Joint Surg.* 87b:721-729.
- Yu M., Xiao Z., Shen L. & Li L. 2004. Midtrimester fetal blood derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. *Brit. J. Haematol.* 124:666-675.