

# Obtenção e isolamento de células-tronco da medula óssea

*Obtaining and isolating stem cells from bone marrow*

<sup>1</sup> Mariana Serdeira Arbex [m.arbex@yahoo.com.br](mailto:m.arbex@yahoo.com.br)

<sup>1</sup> Thaísa Fagundes Neves

<sup>2</sup> Michel Alexandre Villani Gantus

<sup>1</sup> UniFOA - Centro Universitário de Volta Redonda.

<sup>2</sup> Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA. Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, UEZO.

## Resumo

As células-tronco são células com capacidade de autorrenovação e plasticidade. As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas encontradas na medula óssea que têm capacidade de diferenciar em várias linhagens de células de origem mesodérmica. A medula óssea é um tecido de fácil acesso técnico para obtenção dessas células. Este trabalho, após aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo 011/17, teve como objetivo isolar as CTMs da medula óssea de camundongos, utilizando meio de cultura DMEM isolado e em associação com gradiente de sacarose. Foram utilizados quatro (4) camundongos Swiss fêmeas jovens adultas. O conteúdo da medula óssea foi coletado dos dois fêmures de cada camundongo. O conteúdo de cada camundongo foi unido aos outros e adicionado ao meio de cultura DMEM, sendo centrifugado e analisado, formando um pool de células. Na primeira amostra, somente com meio de cultura, foram obtidas  $4,3 \times 10^6$  células. Após essa contagem, foi adicionado à amostra gradiente de sacarose, que foi centrifugado, separando a camada de células mononucleadas para avaliação, obtendo uma segunda amostra com um total de  $8 \times 10^5$  células. O uso do meio de cultura DMEM isoladamente não foi suficiente para isolar as células-tronco mesenquimais da medula óssea. Associando o gradiente de sacarose, foi possível a contagem das células mononucleadas isoladas, sendo um conteúdo de células reduzido em relação à amostra anterior. O método possibilita a obtenção e isolamento das células-tronco, que seriam importantes em um futuro desenvolvimento de uma terapia celular, por serem imunossupressoras e imunoprivilegiadas, tornando possível seu uso em transplantes alogênicos.

## Palavras-chave:

Células-tronco. Camundongos. Medula óssea. Terapia baseada em transplante de células e tecidos.

## Abstract

Stem cells are cells capable of self-renewal and plasticity. Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult cells found in the bone marrow, which have the ability to differentiate into various cell lines of mesodermal origin. Bone marrow is an easily accessible technical tissue for obtaining these cells. This study, approved by the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA) under protocol 011/17, aimed to isolate the bone marrow MSCs from mice using DMEM culture medium isolated and in association with sucrose gradient. Four (4) female young adult Swiss mice were used. The bone marrow content was collected from the two femurs of each mouse. The contents of each mouse were attached to the others and added to the DMEM culture medium, centrifuged and analyzed, forming a pool of cells. In the first sample, only with culture medium,  $4.3 \times 10^6$  cells were obtained. After this count, the sucrose gradient was added to the sample, which was centrifuged, separating the mononuclear cell layer for evaluation, obtaining a second sample with a total of  $8 \times 10^5$  cells. The use of the DMEM culture medium alone was not sufficient to isolate the mesenchymal stem cells from the bone marrow. By associating the sucrose gradient, it was possible to count the isolated mononuclear cells, with a reduced cell content compared to the previous sample. The method allows obtaining and isolating stem cells, which would be important in the future development of a cell therapy, because they are immunosuppressive and immunoprivileged, making possible its use in allogeneic transplants.

## Keywords:

Stem cells. Mice. Bone marrow. Cell and tissue-based therapy.

## Como você deve citar?

ARBEX, Mariana Serdeira; NEVES, Thaísa Fagundes; GANTUS, Michel Alexandre Villani. Obtenção e isolamento de células-tronco da medula óssea. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, n. 39, p. 107-115, abril 2019.

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido muscular estriado esquelético é caracterizado pela presença de estrias e de células multinucleadas alongadas, comumente chamadas de fibras musculares. Por serem células multinucleadas, formam sincícios que se desenvolvem pela fusão de mioblastos, que são as células pequenas e indiferenciadas precursoras das fibras musculares durante a formação do embrião. O tecido muscular estriado esquelético é responsável por promover a movimentação e sustentação do corpo por possuir capacidade contrátil. A regeneração desse tecido é difícil devido à baixa capacidade proliferativa das suas células, o que reduz a sua autorrenovação (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Normalmente, os seres humanos não produzem novas fibras musculares durante a vida adulta. Entretanto, essa capacidade não é perdida porque a maioria dos órgãos possui capacidade de proliferação celular com a finalidade de renovar e até mesmo reparar pequenas lesões (ALBERTS et al., 2004). As células satélite são um grupo de células mononucleadas localizadas entre a membrana basal e o sarcolema, membrana plasmática da célula muscular. Em uma circunstância normal, as células satélite permanecem em um estado quiescente. Após uma lesão, a fibra muscular pode responder com a regeneração (JARVINEN et al., 2000) ou como uma fibrose (KAARIAINEN et al., 2000), que inibiria completamente o processo de regeneração. Caso a resposta da fibra muscular for de regeneração, as células satélite são ativadas. Elas começam a proliferar, diferenciar e agrupam-se em miotubos, formando a fibra muscular, exercendo um papel semelhante ao das células-tronco em outros tecidos (WU et al., 2012).

A capacidade de proliferação celular para renovar ou reparar lesões é, também, realizada pelas células-tronco, que são células indiferenciadas capazes de autorrenovação e diferenciação. As células-tronco são responsáveis por originar células maduras e diferenciadas (BORELLI, 2005). A fim de resgatar a fisiologia do órgão ou tecido, deve-se manter a quantidade de células, bem como suas funções, dentro dos limites de normalidade. Assim, as células-tronco são necessárias por serem capazes de repor as células que foram perdidas por meio de divisão celular. Como as células satélite agem no tecido muscular estriado esquelético de modo parecido com as células-tronco em outros tecidos, as células satélite recuperam as fibras perdidas e, quando essa resposta regenerativa não acompanha a lesão, as células musculares são substituídas por tecido conjuntivo, sendo prejudicial visto que as células desse tecido não possuem capacidade contrátil (ALBERTS et al., 2004).

As células-tronco são classificadas de acordo com a sua potencialidade, sendo assim totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As células-tronco totipotentes possuem capacidade de originar todos os tipos de células do tecido embrionário e extraembrionário. As pluripotentes originam os tecidos do embrião. Já as multipotentes, geram linhagens celulares específicas, como é o caso das células-tronco mesenquimais (CTM). Além dessas, encontram-se células oligopotentes, que formam linhagens celulares mais restritas, quando comparadas às multipotentes; por fim, existem as unipotentes, que geram somente um tipo celular maduro. Tanto as oligopotentes quanto as unipotentes devem ser consideradas células progenitoras, ou seja, são consideradas comprometidas (SCHWINDT, 2005).

Existem duas fontes de células-tronco, sendo elas embrionárias e adultas. As células-tronco embrionárias (CTE) são provenientes do embrioblasto do blastocisto, cinco dias após a fertilização em humanos. Elas diferenciam espontaneamente em meios de cultura, sendo assim precisam de fatores que impeçam sua diferenciação para que sejam expandidas. Dessa forma, a maior dificuldade na sua utilização é inibir a sua diferenciação. As adultas não diferenciam com tanta espontaneidade e localizam-se em maior quantidade, mas em menor concentração por todo o organismo (SCHWINDT, 2005). Um método muito utilizado para a obtenção de células-tronco adultas é o que ocorre por meio da medula óssea, devido à presença de um número elevado dessas células, pela facilidade da técnica de acesso

(BORELLI, 2005) e devido ao fato de ocorrer migração das células-tronco mesenquimais (CTM) lá presentes para o tecido lesado e sua posterior diferenciação, havendo uma possibilidade de regeneração (BITTENCOURT, 2006). Além disso, dificuldades burocráticas fazem com que as células-tronco adultas sejam mais disponíveis (BORELLI, 2005). Após a extração, as CTM podem ser diferenciadas das demais pela característica de formar colônias de fibroblastos aderidas ao meio de cultura (BITTENCOURT, 2006), ou seja, seu cultivo é feito a partir da seleção de células que estão aderidas, eliminando as que estão em suspensão no meio de cultura (SCHWINDT, 2005).

Um local para extração dessas células é a medula óssea, um tecido conhecido por apresentar células-tronco na vida pós-natal, tendo células-tronco hematopoéticas e CTM, ou estromais, sendo essas capazes de diferenciar em várias linhagens de células de origem mesodérmica e criar um microambiente favorável à hematopoese (BYDLOWSKI et al., 2009), além de dar suporte ao estroma para o crescimento e a diferenciação das células-tronco hematopoéticas (SCHWINDT, 2005). Acredita-se na existência de células-tronco em quase todos os tecidos do organismo adulto, tanto de células progenitoras comprometidas quanto de células que geram tecidos diferentes de sua origem. Estudos evidenciaram que as células que são extraídas da medula óssea podem gerar células neurais e hepáticas, além dos diferentes tipos de músculo – cardíaco, esquelético e liso (SCHWINDT, 2005).

As células-tronco estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas terapias celulares, incluindo a regeneração do músculo estriado esquelético (SCHWINDT, 2005). As células-tronco são indiferenciadas com capacidade de autorrenovação, ou seja, multiplicam-se, mantendo seu estado indiferenciado, repondo ativa e constantemente sua população nos tecidos. Além disso, elas são capazes de diferenciar em diversos tipos celulares devido ao processo de divisão assimétrica. Assim, acredita-se que as células-tronco possuam papel regenerativo frente a uma lesão ou injúria (BYDLOWSKI et al., 2009). As CTM apresentam grande utilidade no que tange à clínica, visto que são células imunoprivilegiadas, ou seja, tem pouca ou nenhuma resposta imune, e também são imunossupressoras, diminuindo a ação do sistema imunológico do organismo. Isso faz com que essas células sejam importantes no transplante alogênico, reduzindo a rejeição a enxertos (NAUTA et al., 2006). Assim, o presente artigo tem como objetivo obter e isolar células-tronco provenientes da medula óssea de camundongos Swiss.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Biotério e no laboratório de Biotecnologia do Centro Universitário de Volta Redonda. Obtivemos as células-tronco da medula óssea de quatro camundongos fêmeas de, aproximadamente, 30 gramas cada e, para isso, foi necessário o uso de agulha 25 x 7, seringa de 20ml, material cirúrgico (tesouras e pinças), meio de cultura (DMEM), placas de Petri de plástico de 60mm, tubos plásticos e pipeta tipo Pasteur (BORELLI, 2005). Além disso, foram utilizados 2 microlitros de Ketamina por grama e gradiente de sacarose a 15%. Foram usadas, também, lâminas de histologia, kit rápido de colorantes para uso hematológico (RenyLab).

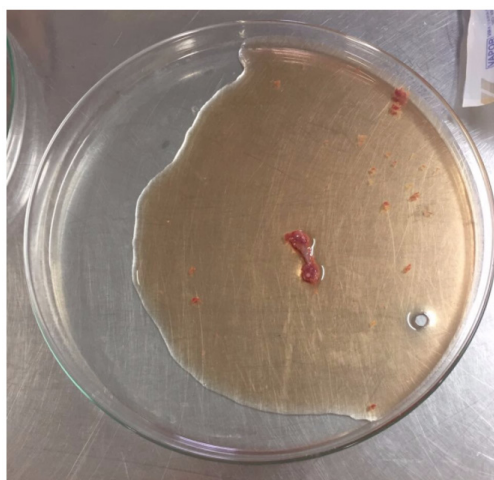
Mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UniFOA), sob protocolo 011/17 e dispondo dos materiais adequados, iniciamos o procedimento anestesiando os camundongos, com 2 microlitros de Ketamina por grama, sendo que cada camundongo possuía, aproximadamente, 30 gramas, a fim de eutanasiá-los. Em condições assépticas, realizamos uma incisão cutânea na região anterior de ambas as coxas, seccionando a camada muscular para exposição dos fêmures. Após sua exposição, seccionamos os fêmures entre as articulações fêmur-ílica e fêmur-tibial. Com o auxílio da agulha e da seringa, injetamos 2ml de meio de cultura em cada canal medular. O conteúdo de cada canal medular foi unido e a suspensão foi colocada em placas de Petri ou em tubos plásticos, formando um pool de células, ou seja, um agrupamento de todas as células. Essa suspensão foi homogeneizada

cuidadosamente com a pipeta tipo Pasteur para a dispersão mecânica do tecido. Esse material foi centrifugado, dando origem à primeira amostra, que foi contada na Câmara de Neubauer e analisada. Logo depois, foram centrifugados 3ml da amostra total em 6ml gradiente de sacarose a 15% para alcançar a densidade celular de, aproximadamente, 1,077g/ml, permitindo o isolamento da camada de células mononucleadas e contagem do número de células obtidas na Câmara de Neubauer (BORELLI, 2005), configurando a segunda amostra. A contagem das células foi realizada no quadrante 1A e o número de células encontrado foi multiplicado por  $10^4$  para determinar a concentração de células por mililitro de solução (GORJÃO, 2005). Para a preparação das lâminas das células obtidas, o material foi colocado sobre elas e, após secagem, as lâminas foram coloridas segundo instruções do kit de corantes rápidos (panótico) do laboratório Renylab, sendo primeiro com o Corante Rápido 1, o agente fixador, seguido do Corante Rápido 2, a solução corante de hemácias e, por último, pelo Corante Rápido 3, a solução corante de leucócitos e plaquetas. Depois, o resultado obtido foi avaliado em microscópio.

### 3 RESULTADOS

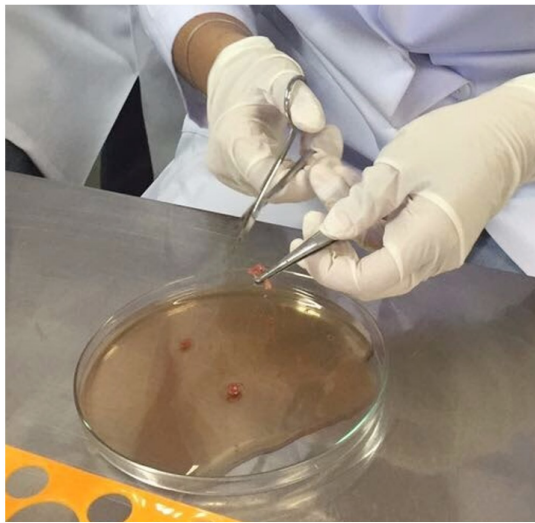
Após a secção do músculo quadríceps femoral e isolamento do fêmur (Fotografia 1), as articulações fêmur-íliaca e fêmur-tibial foram cortadas e as epífises removidas (Fotografia 2). Foi injetado meio de cultura na medula óssea com auxílio de uma agulha e seringa (Fotografia 3), armazenado nos tubos plásticos junto com o conteúdo removido da medula. Esse conteúdo passou por contagem na câmara de Neubauer através de um microscópio invertido, na qual foram encontradas  $4,3 \times 10^6$  células. Foram preparadas lâminas histológicas com o conteúdo obtido nessa amostra (Fotografias 4 e 5). Observou-se um número elevado de células provenientes de todo o conteúdo da medula óssea. Após isso, o conteúdo foi centrifugado com gradiente de sacarose a 15%, a fim de isolar a camada de células mononucleadas. Com isso, obteve-se uma nova amostra, na qual foi possível observar uma redução do número de células, totalizando  $8 \times 10^5$  células de características distintas das anteriores, as quais pudemos afirmar que eram células mononucleares (Fotografias 6 e 7), das quais fazem parte as células-tronco, por possuírem as características morfológicas de células volumosas, núcleo central e vesiculoso, nucléolo evidente e citoplasma rico em organelas (GLEREAN; SIMÕES, 2013).

Fotografia 1 – Fêmur do camundongo Swiss isolado após secção das articulações fêmur-íliaca e fêmur-tibial.



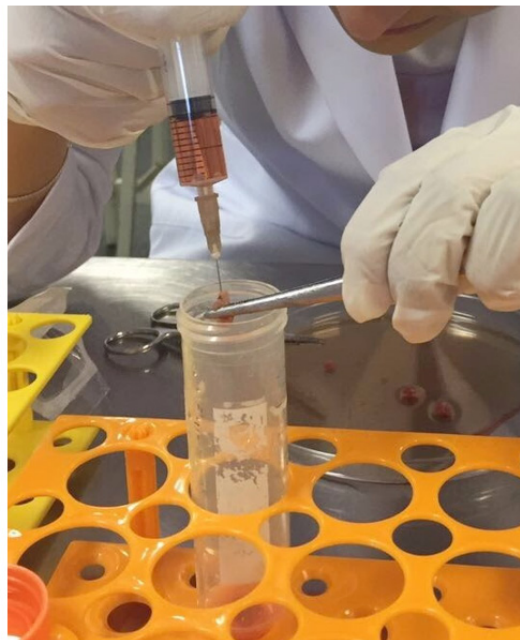
Fonte: autores, 2017.

Fotografia 2 – Remoção das epífises do fêmur do camundongo Swiss para injeção de meio de cultura.



Fonte: autores, 2017.

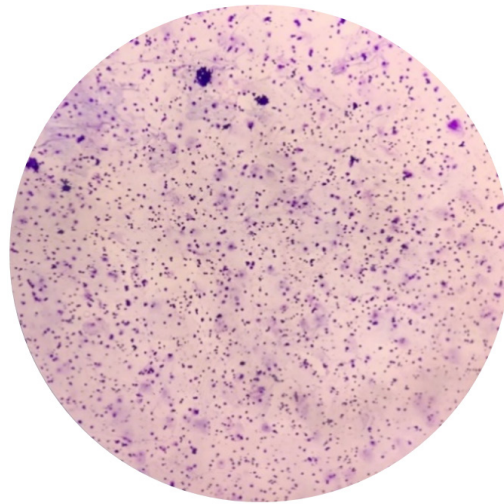
Fotografia 3 – Injeção de meio de cultura em canal medular do fêmur do camundongo Swiss para retirada das células.



Fonte: autores, 2017.

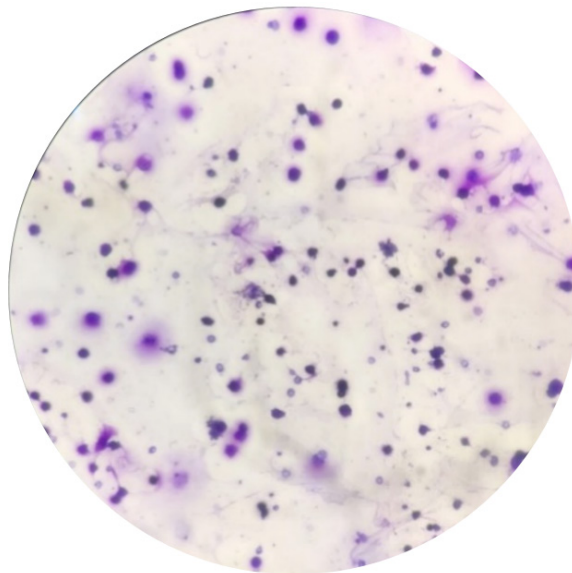


Fotografia 4 – Imagem microscópica da primeira amostra (objetiva 4), mostrando todo o conteúdo celular da medula óssea, com células em diferenciação.



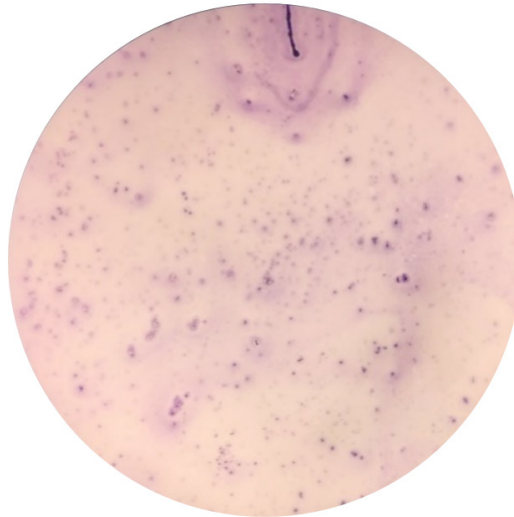
Fonte: autores, 2017.

Fotografia 5 – Imagem microscópica da primeira amostra (objetiva 40), mostrando todo o conteúdo celular da medula óssea, com células em diferenciação.



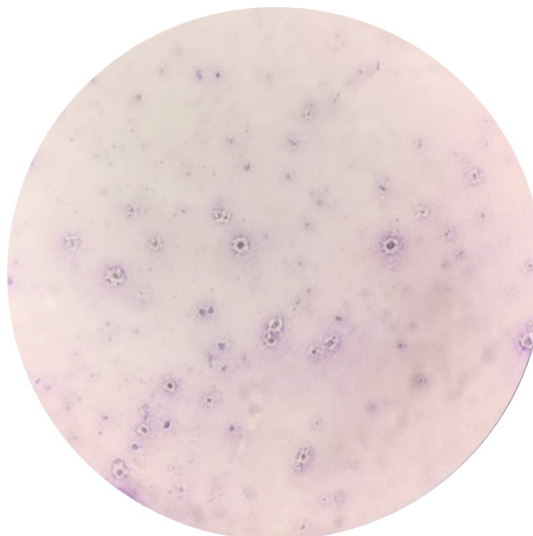
Fonte: autores, 2017.

Fotografia 6 – Imagem microscópica da segunda amostra (objetiva 4), mostrando celularidade reduzida em relação à amostra anterior.



Fonte: autores, 2017.

Fotografia 7 – Imagem microscópica da segunda amostra (objetiva 40), mostrando celularidade reduzida em relação à amostra anterior, podendo ser identificadas células volumosas, com núcleo central vesiculoso, nucléolo evidente e citoplasma rico em organelas (GLERAN; SIMÕES, 2013)



Fonte: autores, 2017.

## 4 DISCUSSÃO

A partir dos resultados, foi observado que é possível obter células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos de forma acessível com o uso do meio de cultura DMEM. Ao centrifugar somente com meio de cultura, foram observadas as células da medula óssea em sua totalidade.

O gradiente de sacarose a 15% permitiu a separação da camada de células mononucleares do restante de células da medula óssea após a centrifugação, melhorando o método, pois reduziu o número de células totais, porém forneceu uma densidade maior das células mononucleadas na amostra. Esse resultado foi obtido porque, ao usar o gradiente de sacarose, a camada de células mononucleadas ficou em suspensão, permitindo sua coleta e contagem. Pudemos observar através das características morfológicas que as células remanescentes após a centrifugação foram as células-tronco, devido às características de células volumosas, com núcleo central vesiculoso, nucléolo evidente e citoplasma rico em organelas (GLERAN; SIMÕES, 2013).

O método utilizado neste trabalho é fácil tecnicamente, porém invasivo, pois, para a obtenção das células desejadas, foi necessário retirar o fêmur e cortar as articulações, bem como as epífises. Sua aplicação em humanos seria de modo menos invasivo, visto que, para a obtenção das células medulares, bastaria uma punção de medula óssea e não a secção de completa de um membro. A partir da obtenção e do isolamento das células, essas seriam cultivadas em laboratório, induzindo sua proliferação e, conseqüentemente, aumentando o número de células disponíveis para o trabalho. Futuramente, essas células podem ser usadas para realizar uma terapia celular para regeneração do músculo estriado esquelético, sendo injetadas diretamente no local da lesão.

## 5 CONCLUSÃO

O método usado possibilita a obtenção de células da medula óssea, bem como posterior isolamento das células mononucleares. Somente o uso do meio de cultura DMEM isoladamente não foi suficiente para isolar as células-tronco mesenquimais da medula óssea, mostrando o conteúdo total de células provenientes desse tecido. Já o uso do meio de cultura associado ao gradiente de sacarose possibilitou a contagem das células mononucleadas isoladas, sendo um conteúdo de células reduzido em relação à amostra anterior. Essa obtenção é importante para o desenvolvimento de uma terapia celular, visto que as CTM são células imunoprivilegiadas e imunossupressoras, evidenciando sua importância em transplantes alogênicos, reduzindo a rejeição a enxertos.

A fim de buscar procedimentos menos invasivos, estão sendo descritas técnicas envolvendo a célula do próprio paciente tentando aproximá-las do potencial de células-tronco embrionárias. Isso tem sido feito através da introdução de genes presentes nas células-tronco embrionárias em células completamente diferenciadas, levando a uma reprogramação do núcleo da célula somática, de forma a adquirir pluripotência induzida. Por essas células serem derivadas do próprio paciente, elas seriam úteis em enxertos com sucesso e restauração ou substituição de células lesadas ou deficientes (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 1463 p.
- BITTENCOURT, R. A. C. et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortop. Bras.** v. 14, n. 1, 2006.
- BORELLI, P. Célula-Tronco. In. PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. p. 54-58, 2005, 283 p.
- BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.
- GLEREAN, A.; SIMÕES, M. J. **Fundamentos de histologia para estudantes da área de saúde**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2013, 372 p.
- GORJÃO, R. Contagem de células. In. PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. p. 22-24, 2005, 283 p.
- JARVINEN, T. A. H. et al. Muscle strain injuries. **Current opinion on rheumatology**. v. 12, p. 155-161, 2000.
- KAARIAINEN, M. et al. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**. v. 10, p. 332-337, 2000.
- KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 699 p.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 928 p.
- RENYLAB, **Kit corante rápido (panótico)**. Disponível em: <http://renylab.ind.br/wp-content/uploads/2013/06/CORANTE-R%C3%81PIDO-PB.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- NAUTA, A. J. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood Journal**. v.108, n. 6, 2006.
- SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**. v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.
- WU, J. et al. Correlation between Innervation of Skeletal Muscles and Myoblast Stem Cells. **Int. J. Morphol.** v. 30, n. 4, p. 1532-1537, 2012.