

# Isolamento e cultivo de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo de muares

Gustavo dos Santos Rosa<sup>1</sup>, Vitor Hugo Santos, Jaqueline Brandão de Souza, Betsabéia Heloísa Gentilha Milani, João Pedro Hübbe Pfeifer, Celso Antônio Rodrigues, Carlos Alberto Hussni, Marcos Jun Watanabe, Ana Liz Garcia Alves

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

\*Autor correspondente  
e-mail: gustavo.rosa@fmvz.unesp.br

## Resumo

Células estromais mesenquimais multipotentes (CEM) consistem em uma população celular heterogênea com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, de modulação do estresse oxidativo e de produção de fatores de crescimento, vastamente pesquisadas e utilizadas nos últimos anos. O tecido adiposo é a fonte de obtenção de CEM mais utilizada devido ao baixo custo, desconforto mínimo e grande volume celular obtido. A literatura descreve técnicas de isolamento de CEM derivadas de tecido adiposo (CEMAD) em bovinos, caninos, caprinos, equinos, suínos, humanos, camundongos e ratos, realizadas previamente com êxito. Entretanto, não há conhecimento dos autores acerca de relatos científicos prévios sobre CEM em animais híbridos, como muares. O presente estudo objetivou realizar o isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo de muares. Foram utilizados dois muares hígidos (o estado de hígidez foi confirmado através de exames físicos e laboratoriais - funções hepática, renal e muscular), de quatro e oito anos, com peso médio de 320 kg. Após sedação e anestesia local, amostras de 02 g de tecido adiposo foram coletadas da região subcutânea supra-glútea dos animais e submetidas à fragmentação mecânica, dissociação enzimática e posterior cultivo in vitro para o isolamento das CEMAD, segundo protocolo descrito de maneira consistente na literatura. Decorridas 48 horas do plaqueamento inicial, foi possível observar aderência média de 10% das células ao fundo da garrafa de cultivo. As CEMAD adotaram morfologia fibroblastóide evidente no 8º dia após o plaqueamento, com 80% da área da placa preenchida por células aderidas. A confluência total inicial foi atingida no 11º dia da cultura primária, com a formação de um tapete em monocamada celular, caracterizando ausência de comportamento neoplásico. Foi então realizada a segunda passagem (P2), sendo necessários 21 dias para atingir a confluência total, estágio ideal para aplicação ou criopreservação. A viabilidade celular média foi avaliada nesta etapa, através de contagem em câmara de Neubauer sob coloração com Azul de Tripán, atingindo 95% na amostra advinda



do animal de quatro anos e 96% no animal de oito anos, resultado similar ao obtido em cultivos de CEM em humanos. Não foram observadas diferenças entre as taxas de crescimento celular entre as diferentes idades. Em humanos, observa-se maior taxa de crescimento e melhor diferenciação em células provenientes de amostras coletadas de pacientes mais jovens - com menos de 45 anos - em relação a pacientes portando idade média (entre 45 e 60 anos). Analogicamente, pode-se hipotetizar que a diferença de idade entre os mueres utilizados neste estudo não foi suficientemente grande, acomodando-os na mesma faixa etária média e, portanto, mesmo ritmo metabólico. Após a confluência total em P2 e análise de viabilidade, as CEMAD foram criopreservadas em meio comercial Bambanker<sup>®</sup>, criando um biobanco celular. O presente trabalho demonstrou a viabilidade do isolamento e cultivo de CEM derivadas do tecido adiposo de mueres, tornando possível a realização de estudos adicionais para a elucidação das funções biológicas, comportamento e potencial terapêutico das CEM nestes animais.

**Palavras-chave:** Mulas. Células-tronco. Medicina regenerativa.