

Comparação entre dois protocolos de isolamento de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano

Kerlin Quintiliano ^{a*}; Lisiane Bernardi ^{a,b}; Daniela Steffens ^{a,c}; Cristiane Scher ^a; Thayane Crestani ^a Raquel Fernandes ^d, e Patricia Pranke ^{a,c,e}

^a Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia; ^b Curso de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia;

^c Curso de Pós-graduação em Ciência dos Materiais; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^d Hospital Nossa Senhora da Conceição,

^e Instituto de Pesquisa com Células-tronco; Brasil

kerlinquinti@gmail.com

Introdução: O cordão umbilical humano (CUH) é fonte rica em células-tronco mesenquimais (CTMs) conforme descrito em diversos estudos. Muitas técnicas são utilizadas para obter CTMs e suas variações estão relacionadas com a parte do tecido da qual as CTMs podem ser extraídas (veia umbilical, artérias, *Wharton's jelly* e o próprio CUH em sua totalidade). Nesse sentido, é muito importante comparar e aprimorar os métodos de isolamento, a fim de obter o maior número de CTMs com o intuito de aumentar o sucesso e a expansão da cultura para posterior utilização em terapias celulares. Neste estudo dois diferentes protocolos de isolamento, foram comparados, com o objetivo de otimizar o processo de obtenção de CTMs no laboratório de células-tronco da UFRGS.

Materiais e métodos: Amostras de CUHs (n = 10) foram seccionados em duas partes durante a coleta, cada fração deste par foi isolada, simultaneamente, seguindo os seguintes grupos, de acordo com cada protocolo: Grupo 1 - células isoladas a partir da veia umbilical e Grupo 2 - células isoladas a partir da veia e das artérias, utilizando digestão mecânica adicional. As células foram mantidas nas mesmas condições de cultura e depois de atingir a passagem 5 da cultura, os grupos foram comparados em diversos aspectos: parâmetros de isolamento, características da proliferação celular, análise imunofenotípica, potencial de diferenciação celular nas três camadas germinativas e taxa de proliferação. A taxa de proliferação foi determinada através do percentual celular expresso para o marcador de proliferação celular Ki67. Para obter o número total de células por campo, essas foram incubadas com o marcador de núcleos DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por um minuto.

Resultados: O Grupo 1 demonstrou melhores resultados no isolamento com taxa de sucesso de 90%, em comparação com 70% de taxa de sucesso do isolamento do grupo 2. Ambos grupos foram capazes de obter CTMs e as demais análises não demonstraram diferenças significativas entre eles.

Conclusão: De acordo com as condições adotadas no laboratório de células-tronco da UFRGS, o protocolo utilizado no grupo 1 é mais vantajoso por apresentar menor custo e melhor taxa de sucesso no isolamento.

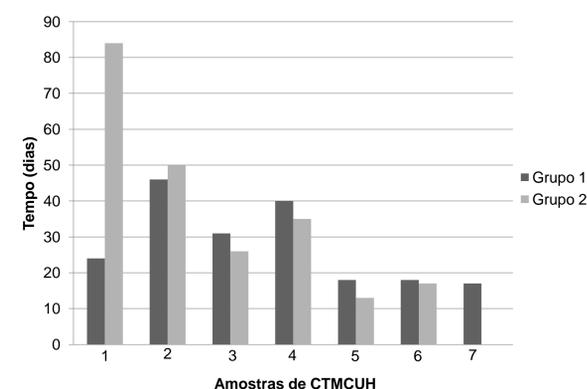


Figura 1 - Análise comparativa dos grupos até a primeira passagem. A média para atingir a primeira passagem (dias) foi similar entre os grupos ($p=0,756$).

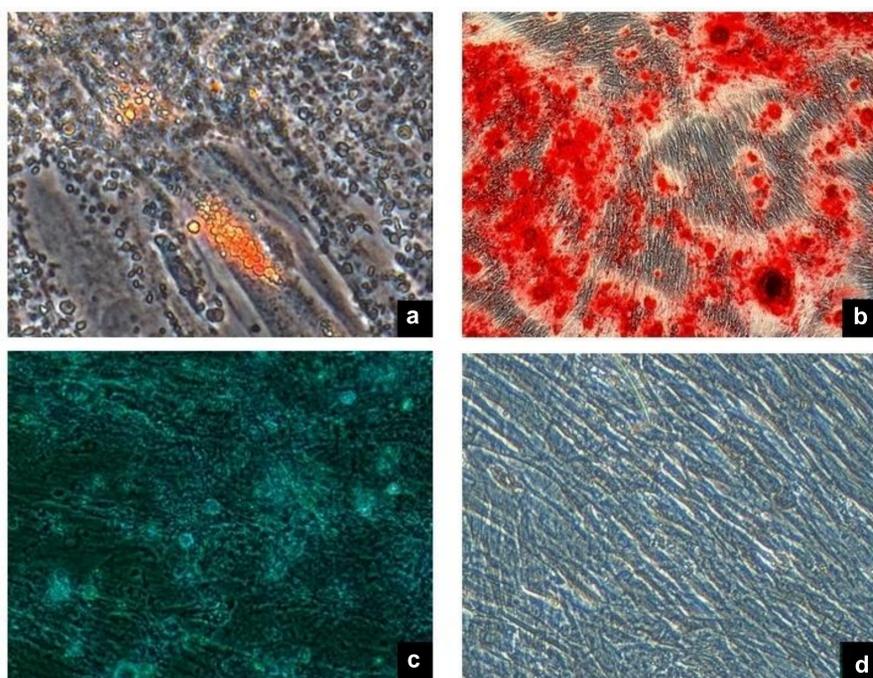


Figura 2 - Potencial de diferenciação das CTMCUH (a) diferenciação adipogênica (b) diferenciação osteogênica (c) diferenciação condrogênica e (d) controle negativo.

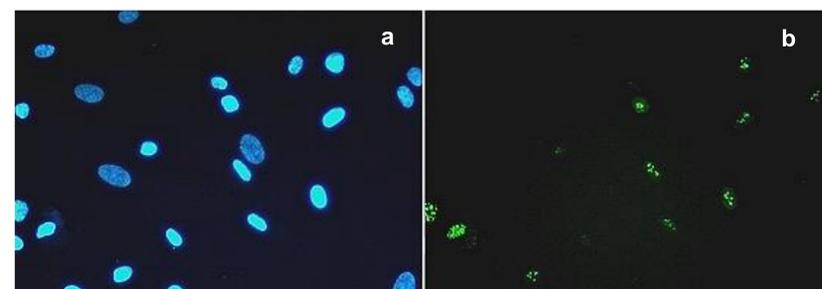


Figura 3 - Análise de imunofluorescência das CTMCUH (a) Total de células marcadas com DAPI em um campo (b) Células imunopositivas para o anticorpo monoclonal Ki-67 no mesmo campo da figura 3a.

Tabela 1 - Descrição da densidade celular semeada e percentual da taxa de sucesso no isolamento.

	Grupo 1 (n=10)	Grupo 2 (n=10)	p
Densidade (célis/cm²)			
Média ± DP	924.784 ± 1.092.810,51	483.467 ± 427.166,90	0,393 ^a
Mínimo - máximo	41.040 - 3.480.000	44.000 - 1.328.000	
Taxa de Sucesso			
Com Sucesso	9 (90%)	7 (70%)	0,007 ^b
Sem Sucesso	1 (10%)	3 (30%)	