

CULTIVO DE CARDIOMIÓCITOS SUÍNOS

[Culture of swine cardiomyocytes]

Caio Sabino de Oliveira¹, Erika Branco^{2*}, Emerson Ticona Fioreto³, Daniele dos Santos Martins⁴, Guilherme Buzon Gregores¹, Rosa Cabral⁵, Guilherme José Ferreira⁶, Carlos Alberto Palmeira Sarmiento¹, Maria Angelica Miglino¹

¹Departamento de Cirurgia, FMVZ, USP, São Paulo, SP, Brasil.

²Instituto de Saúde e Produção Animal – ISPA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Belém, Belém, PA, Brasil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Morfologia, UFSE, Aracajú, SE, Brasil.

⁴Departamento de Zootecnia, FZEA/ZA, USP, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Centro de Ciências Agrária, FMV, UFPI, Campus de Teresina, Teresina, PI, Brasil.

⁶Centro de Ciências Agrária, FMV, UFPI, Campus “Prof. Cinobelina Elvas” – CPCE – UFPI, Bom Jesus, PI, Brasil.

RESUMO - A insuficiência cardíaca é uma das doenças mais deletérias no mundo ocidental. Muitas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de promover novos e mais eficientes abordagens terapêuticas para a doença. Estas novas propostas terapêuticas tem ênfase nas origens dos processos patológicos e no re-estabelecimento da funcionalidade, tal como nos transplantes de células lisas ou estriadas musculares, de cardiomiócitos fetais e adultos no tecido cardíaco fibrosado. Neste estudo, protocolos desenvolvidos e testados em ratos e camundongos e previamente publicados foram adaptados para cardiomiócitos suínos, objetivando estabelecer um protocolo para cultivo de cardiomiócitos em suínos. Três protocolos foram testados (A- digestão enzimática em coração de adulto, B- digestão enzimática em coração fetal e C- explante de coração adulto e fetal) e apenas um produziu resultados confiáveis (protocolo B) sugerindo a formação de fibras cardíacas, no entanto, faz-se necessária avaliação imunocitoquímica e análises ultraestruturais para a confirmação da hipótese.

Palavras-Chave: Cultivo celular, coração, cardiomiócitos suínos.

ABSTRACT - Cardiac insufficiency is one of the most harmful disease in the occidental world; A range of researches have been developed in order to provide new and more efficient therapeutics for the disease. New therapeutics purposes have been directed to the origin of the pathological process and aim to re-establish functional physiology, as in transplants of cells like smooth or striated muscular cells, fetal or adult cardiomyocytes into the fibroid myocardium. In this study, previous published protocols developed in rats and mice were adapted for swine cardiomyocytes. The main goal was to stablish a viable protocol for swine cardiomyocyte culture, and the establishment of an experimental model using swine. Three protocols were tested (A - enzymatic digestion in adult heart; B- enzymatic digestion in fetal heart; C - explant of samples of adult and fetal hearts. We observed that protocol B produced a reliable result suggesting cardiac fibre formation, although, further immunecitochemistry and ultrastrucutural will be investigated to confirm the hypothesis.

Keywords: Cell culture, heart, swine cardiomyocytes.

INTRODUÇÃO

Os cardiomiócitos são células altamente diferenciadas e logo após os primeiros anos de vida param de se multiplicar, desta forma, o crescimento do coração é consequência da hipertrofia e não da hiperplasia celular. A morte dos cardiomiócitos, por exemplo, como consequência de um infarto do miocárdio, faz uma fibrose tissular, que dependendo de sua extensão pode levar à insuficiência cardíaca

(Scorsin et al., 1996), doença que mais mata no mundo ocidental (Mummery et al., 2003; Lee et al., 2004).

Para os mais diversos tipos de patologias cardíacas, podemos elencar inúmeras opções, que variam entre administração de medicamentos e procedimentos cirúrgicos. No caso desta última alternativa, as manobras oscilam desde as mais radicais como o transplante cardíaco, o qual há limitações como

* Autor para correspondência. E-mail: erika.branco@ufra.edu.br.

imunossupressão e rejeição do órgão transplantado (Winitsky et al., 2005), e a modificação geométrica do coração, até as menos invasivas como o implante de marcapasso biventricular (Murry et al., 1996).

Entre as novas linhas de pesquisa que visam tratar a insuficiência cardíaca; algumas se destacam por atuar na origem do processo patológico. Uma delas é a administração dos fatores angiogênicos, com o intuito de recuperar a vascularização adequada, melhorando a perfusão miocárdica. Em seguida, podemos citar o transplante de células musculares estriadas esqueléticas e lisas, de cardiomiócitos fetais e cardiomiócitos adultos no miocárdio fibrosado, com o objetivo de recuperar o seu caráter funcional. Estes tipos de procedimentos tem sido realizados nos últimos anos em diferentes modelos experimentais e em diferentes centros de pesquisa no mundo com o objetivo de determinar qual a célula que apresenta mais vantagens na colonização da área infartada (Sakai et al., 1999), atuando na forma de reabilitação tecidual o que nos leva a pensar na medicina regenerativa, a qual está implicada à órgãos considerados incapazes de desenvolver quaisquer processos de regeneração, como cérebro, medula espinhal e coração (Santos et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram de acordo com o Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, sob o número 1010/2006.

Para o desenvolvimento desta pesquisa desenvolvemos diversos protocolos utilizando tanto coração de suínos adultos quanto coração fetal.

Digestão enzimática

Para o cultivo dos cardiomiócitos adultos de suínos, tivemos que submeter o tecido cardíaco ao processo de digestão enzimática, e para tanto testamos 2 protocolos com diferentes enzimas: Tripsina - protocolo A e Colagenase tipo 2 associada à Elastase Pancreática – protocolo B.

Protocolo A - Este protocolo foi testado com tecido cardíaco de suíno adulto, com média de peso de 40 Kg, saudável, oriundo de uma granja da região próxima a cidade de São Paulo (Ibiúna), que permaneceu alojado por um período máximo de 3 dias, em baias apropriadas para a espécie, pertencentes ao Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP.

O animal foi ortotanasiado e foram coletados diversos fragmentos do coração, sendo estes acondicionados em um tubo cônico com DMEM.

Em fluxo laminar, foi retirado epicárdio e endocárdio e os fragmentos foram cortados em tiras, colocando-as submersas em tripsina. A solução permaneceu sob agitação moderada à 37°C por 20 minutos, repetindo-se o procedimento 5 vezes. Após a dissociação, as amostras foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos, à 37°C, os sedimentos (*pellets*) foram resuspendidos em soro fetal bovino (SFB) e submetidos à nova centrifugação. O pellet resultante foi resuspendido em DMEM suplementado com 10% de soro fetal de cavalo, 5% SFB, 1% gentamicina e 1% streptomomicina. As células foram incubadas em garrafas de cultura (25cm²) por 2 horas para adesão de fibroblastos. Após esse período, coletou-se o sobrenadante, sendo acrescentado Ficoll-Paquetm e centrifugado por cinco minutos, à 37°C, sob 1200rpm .

O *pellet* resultante foi resuspendido em DMEM (contendo 10% de soro fetal equino, 5% de SFB, 1% gentamicina e 1% estreptomomicina) e centrifugado nas mesmas condições anteriores.

Realizamos a contagem celular e as células foram plaqueadas em placas de 4 poços nas concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 células/poço.

As placas foram mantidas em estufa com atmosfera úmida a 37 °C e 5% de gás carbônico (CO₂). Após 72 horas, o meio foi trocado por DMEM contendo 1% de gentamicina e 1% de streptomomicina, sem soro. As trocas de meio subsequentes foram realizadas a cada 48 horas.

Protocolo B - Este protocolo foi realizado com coração fetal de suínos obtido do Frigorífico Itapeperica S/A FISA.

Após abertura asséptica do útero, um total de 10 fetos com aproximadamente 2 meses de gestação foi colocado em fluxo laminar para remoção do coração. Em placa de Petri, separamos tecido adiposo e átrios, lavando 2 vezes o material com 5ml de solução Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) para remoção do sangue.

Em seguida o coração foi colocado em 5ml de solução HBSS com Colagenase tipo II e Elastase pancreática sendo pré-incubado por 20 minutos à 37°C.

Ao término deste processo, o coração foi cortado em pequenos pedaços, os quais foram colocados em uma

nova solução HBSS com Colagenase tipo II e Elastase pancreática e incubados por 2 horas à 37°C. A cada 30 minutos, a solução contendo os fragmentos era pipetada para melhor homogeneização das enzimas com os fragmentos cardíacos.

Posteriormente, foi adicionado 1ml de soro fetal à solução e centrifugamos por 7 minutos, a 1000rpm e à temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante, o pellet foi resuspendido em 5ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.

A solução contendo as células foi acondicionada em garrafa de cultivo de 25cm² e mantida em estufa à 37°C com CO₂ a 5%. A cada 48 horas realizava-se a troca parcial do meio da cultura.

Além dos protocolos de digestão enzimática, realizamos também protocolo de explante tanto de coração adulto, quanto de coração fetal, constituindo então, nosso protocolo C.

Protocolo C - Tanto o material obtido de coração de suíno adulto quanto do coração de feto de suíno foi lavado 2 vezes com DMEM contendo 2% de estreptomicina e posteriormente, cada material foi fragmentado em placa de petri contendo DMEM.

Garrafas de cultivo de 25cm² foram preparadas com fina camada de SFB para implantação dos fragmentos cardíacos e encubadas por 48h a 37°C, sendo adicionado a cada garrafa, 5ml de DMEM com SFB. A cada 48 horas realizava-se a troca parcial do meio da cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo A forneceu células sem grandes

prolongamentos citoplasmáticos, sem morfologia definida, havendo pequena proliferação das mesmas no cultivo, levando a um resultado nada satisfatório. Além disso, o tempo de cultivo foi de oito dias, pois o crescimento celular não evoluiu e as células acabaram morrendo, não formando nenhuma célula com aspectos morfológicos que indicassem ser um cardiomiócito (Figura 1 A e B). O insucesso no cultivo de cardiomiócitos adultos pode-se dever ao fato de se tratar de células altamente diferenciadas que não podem sintetizar DNA rapidamente, possuem síntese protéica lenta e são ditos como células permanentes, ou seja, que não têm capacidade de entrar novamente no ciclo celular (Oliveri, 2000). Ou seja, possivelmente, as células cardíacas adultas isoladas neste trabalho, não foram em número suficiente para formar um cultivo que se auto-perpetuasse, já que, neste caso, a multiplicação celular não ocorre.

Além disso, segundo Nadal-Ginard (2001) cardiomiócitos adultos, quando cultivados *in vitro*, têm menor capacidade de absorção de substâncias vitais para seu desenvolvimento, por se tratar de células de metabolismo lento, o que justifica o fato de nosso cultivo de cardiomiócitos suínos adultos, não oferecer resultados satisfatórios, já que se tratavam de células maduras e de baixa capacidade proliferativa.

Em contrapartida, segundo, Hagege et al. (2003), o cultivo de células fetais permite obtenção de melhores resultados, pois estas células possuem alta capacidade proliferativa *in vitro* e maior capacidade adaptativa, permitindo que elas sejam multiplicadas em quantidades suficientes para que se forme uma estrutura tecidual. Desta forma, o Protocolo B forneceu células com rápida adesão e expansão celular, quando comparado com o tecido adulto. A partir do segundo dia de cultivo, as células passaram

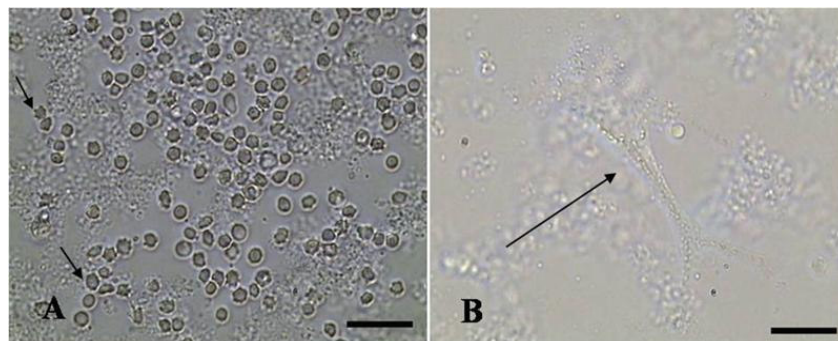


Figura 1 - Fotomicrografias de cultivo de células cardíacas, utilizando-se o Protocolo A. Em (A) elucidamos células em suspensão com pequenas projeções citoplasmáticas (setas), em (B) demonstramos a aderência e a expansão celular. Barra = todas as fotos – 25µm.

a apresentar formato mais fusiforme, dispondo-se em conglomerados e interagindo-se através de seus citoplasmas. Nesta cultura foi possível observar grande quantidade de células de formato fusiforme, com íntimo contato citoplasmático, e em pleno processo de multiplicação, sendo possível observar algumas células com núcleo central e mitótico, tal como descrito por Reinecke et al. (2004), que descreve células de formato fusiforme, com núcleos grandes e centrais e interações citoplasmáticas, como características importantes do tecido cardíaco. A partir do décimo quarto dia de cultivo, era possível

observar células de formato fusiforme característico, que se dispunham na mesma direção, e se confluíam em algumas regiões, formando conglomerados organizados e de íntima relação citoplasmática, o que segundo Junqueira e Carneiro (2006), é uma disposição característica do tecido muscular. No décimo sexto, dia observou-se contatos citoplasmáticos mais definidos, no qual duas ou mais células possuíam a maior parte de sua extensão citoplasmática em contato com outra célula, fator importante para a manutenção do metabolismo celular e sobrevivência da cultura (Figura 2 A-F).

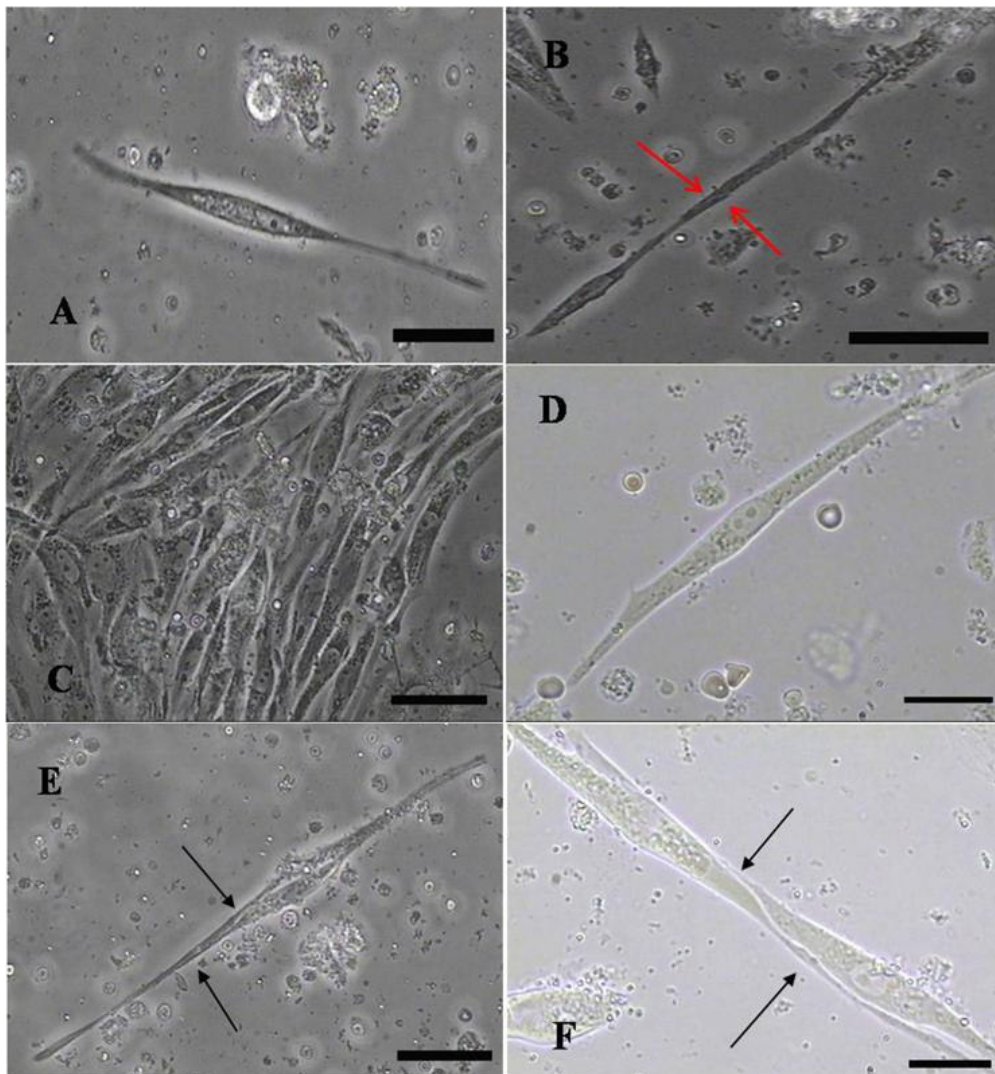


Figura 2 - Fotomicrografia de células cardíacas suínas fetais, utilizando-se o Protocolo B. Em (A) observa-se uma célula de típico formato fusiforme; em (B) observa-se a íntima relação citoplasmática (setas vermelhas) entre duas células de formato fusiforme; em (C) observa-se a íntima relação citoplasmática das células fusiformes dispostas em um único sentido; em (D) observa-se uma célula de formato fusiforme em processo mitótico; em (E) e (F) observam-se células fusiformes com íntima relação citoplasmática (setas pretas). Barra = todas as fotos - 25 μ m.

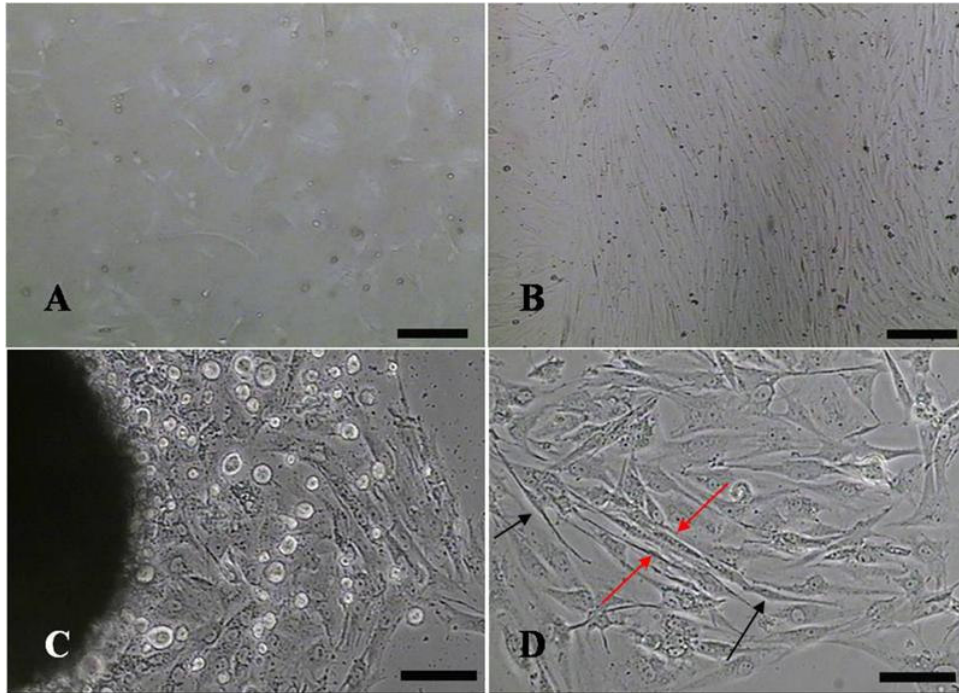


Figura 3 - Fotomicrografia de células cardíacas suínas adultas e fetais obtidas utilizando-se o Protocolo C. Em (A) observa-se células de formato fibroblástico oriundas de tecido adulto, mais espacadas entre si (setas); em (B) observa-se a confluência das células suínas adultas que se destacaram do fragmento; em (C) observa-se grande quantidade de células que se destacaram do fragmento cardíaco fetal; em (D) observa-se células oriundas de tecido fetal, em formato fusiforme (setas pretas) com íntimas relações citoplasmáticas (setas vermelhas). Barra = A e B - 200µm; C e D - 50µm.

Com relação ao Protocolo C, foram obtidas grande quantidade de células de formato fibroblástico e algumas de formato fusiforme, muito semelhantes às obtidas no Protocolo B. A única diferença entre o tecido cardíaco adulto e o fetal é que no fragmento cardíaco fetal, as células se desprenderam mais rapidamente que no fragmento cardíaco adulto (Figura 3 A-D).

A origem e estágio evolutivo das células cardíacas não são os únicos fatores determinantes do sucesso no cultivo. Técnicas adequadas de processamento do material também são de suma importância. Uma técnica não utilizada neste trabalho, mas que pode ser adequada aos protocolos básicos já desenvolvidos e que inspiraram nosso estudo é a preparação de uma superfície adequada das placas que recebem as células para cultivo. As células podem ser plaqueadas em superfícies preparadas com colágeno (tipo I e II), fibronectina, laminina, gelatina ou pronectina (Wagner et al., 1998). Nos primeiros dias de cultivo, as células aderem à superfície e expandem-se. A monocamada de cardiomiócitos formada passa a contrair espontaneamente em dois a três dias. Vanwinkle et al. (1996) descreveram um interessante procedimento de cultivo de cardiomiócitos de ratos,

com a formação de uma matriz extracelular natural, o cardiogel, que é sintetizado pelos fibroblastos cardíacos. Esta matriz contém laminina, fibronectina, colágeno tipo I e II e proteoglicanos, que contribuem imensamente para a matriz extracelular no coração. O cardiogel propicia aderência mais rápida dos cardiomiócitos, diferenciação do citoesqueleto e miofibrilas mais rapidamente e maior desenvolvimento das células. A mesma característica do cardiogel foi verificada por Bick et al. (1998) que publicou um estudo comparando as propriedades da laminina e fibronectina com as propriedades do cardiogel, sendo que a laminina apresenta-se como a matriz menos efetiva no cultivo de cardiomiócitos neonatais, mas é amplamente usada, enquanto que o cardiogel é a matriz mais adequada, porém seu difícil manuseio limita seu uso (Chlopikova et al., 2001).

CONCLUSÃO

Apesar de utilizarmos protocolos básicos de cultivo de cardiomiócitos, testados em ratos e camundongos, concluímos inicialmente que, para cultivo de cardiomiócitos de suínos, o protocolo B foi o que melhor respondeu a proliferação celular, porém,

compreendemos, que apesar dos aspectos morfológicos da cultura tecidual cardíaca de suínos sugerir a produção de cardiomiócitos, faz-se necessária a futura confirmação através de análise ultraestrutural e ensaios imunocitoquímicos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

REFERÊNCIAS

- Bick R.J., Snuggs M.B., Poindexter B.J., Buja L.M., Van Winkle W.B. 1998. Physical, contractile and calcium handling properties of neonatal cardiac myocytes cultured on different matrices. *Cell Adhes. Commun.* 6:301-310.
- Chlopčiková S., Psotová, J., Miketová P. 2001. Neonatal rat cardiomyocytes – a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical Papers* 145(2):49-55.
- Hagege A.A., Carrion C., Menasche P., Vilquin J.T., Duboc D., Marolleau J.P., Desnos M., Bruneval P. 2003. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 361:491-492.
- Lee, M.S., Lill L., Makkar R.R. 2004. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report. *Ann. Intern. Med.* 140:729-737.
- Junqueira L.C., Carneiro J. 2006. *Biologia Celular e Molecular*. 11 ed. Guanabara Koogan. São Paulo, p.170.
- Mummery C., Oostwaard D.W., Doevendans P., Spijker R.; Brink S., Hassink R., Heyden M., Opthof T., Pera M., Riviere A.B., Passier R., Tertoolen L. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-2740.
- Murry C.E., Wiseman R.W., Schwartz S.M., Hauschka S.D. 1996. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.* 98: 2512-2423.
- Nadal-Ginard B. 2001. Generation of new cardiomyocytes in the adult heart: Prospects of myocardial regeneration as an alternative to cardiac transplantation. *Rev. Esp. Cardiol.* 54:543-550.
- Oliveri R. 2000. Apoptosis en la insuficiencia cardíaca. *Rev. Argent. Cardiol.* 68:603-607.
- Reinecke H., Minami E., Poppa V., Murry C.E. 2004. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ. Res.* 94:56-60.
- Santos R.R., Soares M.B.P., Carvalho A.C.C. 2004. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37:490-495.
- Sakai T., Li R.K., Weisel R.D., Weisel R.D., Mickle A.G., Kim E., Tomita S., Jia Z., Yau M. T. 1999. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 68:2074-81.
- Scorsin M., Marrote F, Sabri A, Le Dref O., Demirag M., Samuel J.L., Rappaport L., Menasche P. 1996. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation* 94(suppl 9): II-337-40.
- Vanwinkle W.B., Snuggs M.B., Buja L. M. 1996. Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol* 32:478-485.
- Wagner D.R., Combes A., McTiernan Ch., Sanders V.J., Lemster B., Feldman A.M. 1998. Adenosine inhibits lipopoly- saccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- α . *Circ. Res.* 82:47-56.
- Winitzky S.O., Gopal T.V., Hassanzadeh S., Takahashi H., Gryder D., Rogawski M.A., Takeda K., Yu S.X., Xu Y.H., Epstein N.D. 2005. Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes *In Vitro. PLoS Biol.* 87(3):662671.