



ANÁLISE DE IMAGEM DE CÉLULAS-TRONCO MARCADAS COM NANOPARTÍCULAS OBTIDA A PARTIR DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA



Aline Ordine , Camila Hitomi Murata , Vera Covolan , Lília Souza; Li Li Min

angiekss@gmail.com camila.murata@gmail.com verina@dcci.unipi.it
ldsouza@fcm.unicamp.br limin@fcm.unicamp.br

Laboratório de Neuroimagem Departamento de Neurologia Centro, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas com Células Tronco (CT) estão voltadas ao emprego delas no tratamento de variadas patologias com a promessa de melhorar a qualidade de vida da sociedade. Assim, aliar o estudo das CT com a tecnologia da Ressonância Magnética (RM) torna-se importante na determinação precisa quanto ao local de atuação desse tipo de célula dentro do organismo vivo, para que outros estudos, voltados para abordagens mais práticas destas células, avancem de forma precisa e gerem resultados seguros e satisfatórios.

Nanopartículas de óxidos de ferro são conhecidas por possuírem excelentes propriedades magnéticas e serem atóxicas, uma vez que são passíveis de serem quebradas e utilizadas para formar a hemoglobina sanguínea.

A RM usa o princípio físico de ondas eletromagnéticas que propicia detecção de sinais provenientes de próton intrínsecos dos tecidos humanos que submetido à deflexão (mudança energética induzida) dentro de um campo magnético, liberam energia no seu realinhamento que pode ser quantificada (tempos de relaxação). A diferença de tempo de relaxação é que confere o contraste para excelente resolução espacial. Diferente do SPECT/PET, a RM não usa energia ionizante, sendo que a sua faixa de energia se encontra na frequência de ondas de rádio FM. Nas máquinas clínicas de 2 Tesla (T) a radiofrequência para próton está ajustada para 85 MHz. Outra vantagem é a maior disponibilidade das máquinas de RM, sendo encontrada em qualquer cidade de médio e grande porte.

METODOLOGIA

Na realização dos experimentos, cubetas de polipropileno foram utilizadas para armazenar as amostras sintetizadas cujo sinal seria avaliado em contraste com o da água. As cubetas facilitam a visualização e identificação de cada uma das amostras. Além disso, o posicionamento das amostras durante o processo de obtenção das imagens em RM foi feito de modo a facilitar identificação das mesmas. Na Figura 1, pode ser observado o posicionamento feito com as amostras: os “quadrados” correspondem às amostras contendo o produto das sínteses feitas, enquanto que, os “losangos” correspondem àquelas contendo água, substância utilizada como padrão de contraste para posterior análise da intensidade do sinal.

As amostras contendo nanopartículas sintetizadas foram submetidas à ressonância magnética clínica de 2 Tesla (Elsint, Prestige, Haifa, Israel). Devido à propriedade eletro-magnética dos materiais envolvidos no trabalho (nanopartículas de óxido de ferro e de ouro), foram utilizadas seqüências ponderadas em T2: Spin-echo T2, Fast-spin-echo T2, Gradient-recall-echo T2. Ajustes nos tempos de repetição e eco e no flip angle foram feitos para otimizar o sinal obtido de cada seqüência. As imagens são enviadas via intranet e processadas em uma estação de trabalho e convertidas em formato específico conforme o software de análise. As imagens são analisadas quanto à sua textura e comparadas a um padrão puro do contraste, no caso, a água e a posteriori à imagem da microscopia ótica com coloração para células marcadas.

O software que utilizado para a análise das imagens é o MaZda, escrito em linguagem C++ que trabalha sob os sistemas operacionais Microsoft Windows 9x/NT/2k/XP. A vantagem deste programa está na especificidade do mesmo, uma vez que foi desenvolvido para a análise de imagens digitalizadas obtidas a partir de RM.

Através do programa, foram analisados os tons de cinza (cada pixel corresponde a um tom de cinza) das imagens obtidas pela RM, ou seja, é analisada a textura de uma área da imagem a partir da avaliação das partes escuras e claras desta. Para cada uma das amostras de nanopartículas e de água foi selecionada uma região de interesse (ROI) nas imagens de diferentes seqüências de pulso de RM a partir desta ROI o software faz o cálculo de inúmeros parâmetros.

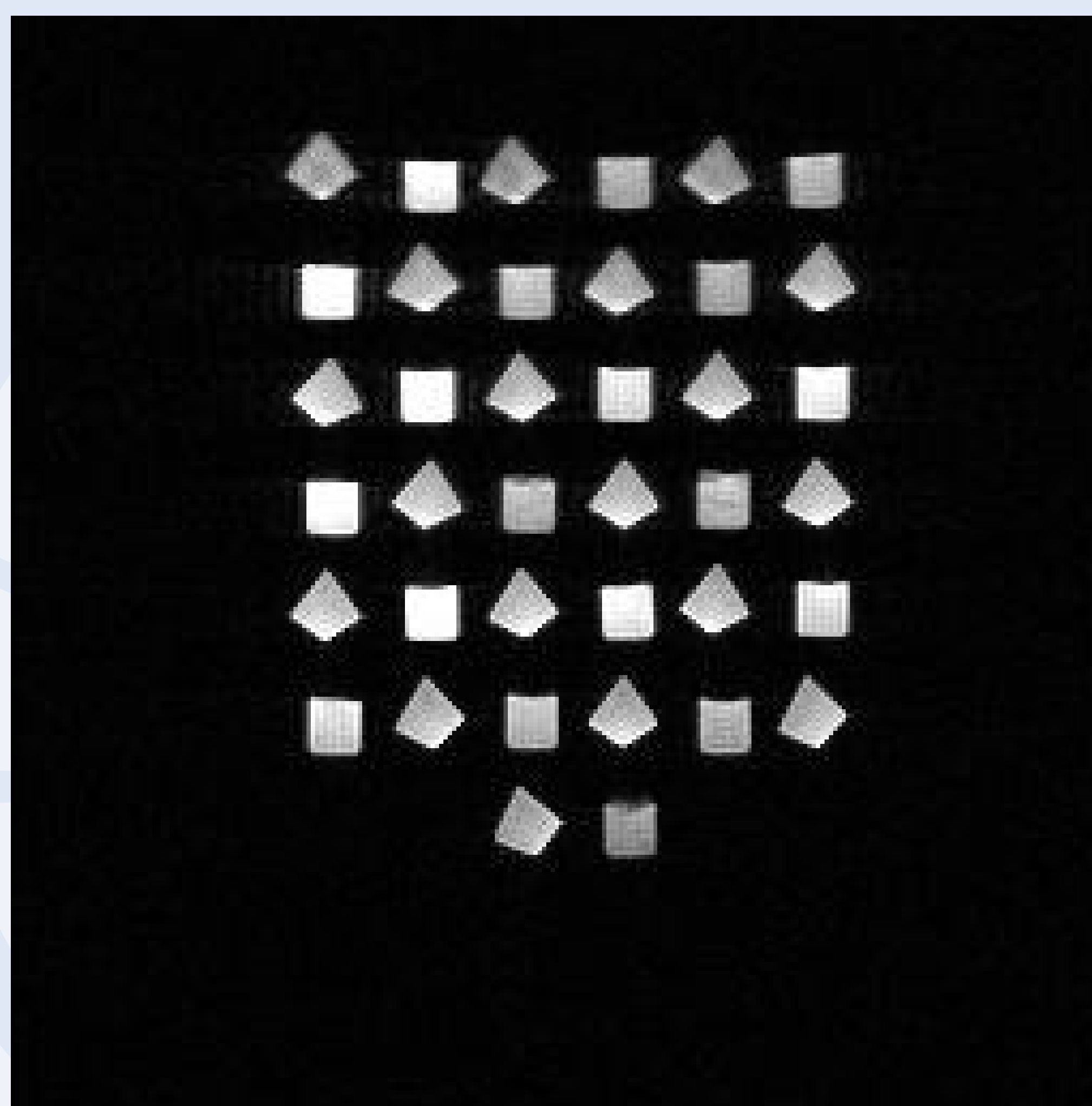


Figura 1- Imagem obtida na RM na seqüência Fast-spin-echo ponderada em T2, primeiro echo.

RESULTADOS

Foram feitos experimentos com nanopartículas sintetizadas por decomposição térmica de $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ que, a partir de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), foram aquelas que se mostraram mais adequadas à finalidade em questão: tamanhos de partícula com estreitas distribuições, contornos esféricos bem definidos e alta cristalinidade nas fases de óxido de ferro de interesse. Além disso, foi feito um experimento com a marcação com as nanopartículas de células HeLa, uma linhagem de células de câncer de colo de útero muito utilizadas em pesquisas médicas, conforme mostra Figura 2.

Experimentos visando encontrar outros marcadores de células foram feitos em colaboração com um grupo da Universidade de Pisa que trabalhava com o desenvolvimento de partículas paramagnéticas não apenas de óxido de ferro, mas também de ouro. Para cada amostra, foi processada uma ROI e esta é, então, comparada à ROI referente às amostras de água adjacentes a ela.

Através do Software, constatou-se um contraste negativo (amostras apresentam menor intensidade de sinal em relação à água) em relação à água enquanto que, em outras seqüências de pulso, o contraste, para uma mesma amostra foi positivo (amostras apresentam maior intensidade de sinal em relação à água, maior brilho em relação à água).

Para cada uma das seqüências, foi gerado um gráfico com os dados da intensidade do sinal de cada amostra em relação à do padrão. Para plotar o gráfico, foram selecionados os valores gerados no software para os parâmetros de percentil, conforme explicitado anteriormente, e traçadas as curvas referentes às médias dos valores das águas nos percentis de 1% (limite inferior) e 99% (limite superior) e os pontos referentes às amostras nos percentis 1%, 50% e 99%.

Ao avaliar a intensidade do sinal a partir da análise dos percentis de cada amostra comparando-os aos do padrão (água), foi possível concluir que a faixa do padrão é invadida por inúmeras das amostras em diferentes experimentos e seqüências de pulsos e que, ainda assim, é possível distinguir amostras que possuíam nanopartículas de um determinado material que apresentaram

sinal negativo daquelas constituídas de outro material e que apresentaram sinal positivo em uma determinada seqüência.

Constatou-se que o melhor contraste obtido para determinadas amostras em uma determinada seqüência de pulso em comparação com as demais, porque esta revelava uma intensidade de sinal visualmente boa e, quando analisada através do programa, havia uma boa diferença para o sinal do padrão. Além disso, temos que a utilização de diferentes seqüências de pulso para uma

mesma amostra revelava resultados interessantes: como dentro de uma mesma obtenção de imagem estavam compreendidas cubetas contendo diferentes tipos de partícula (partículas de óxido de ferro obtidas por diferentes metodologias bem como de ouro), a utilização de diferentes seqüências mostrou que é possível as diferenciarmos umas das outras, uma vez que as propriedades paramagnéticas de cada uma delas são bastante características.

Apesar dos experimentos feitos durante o projeto comprovarem que é possível detectar o sinal de nanopartículas através da RM, faltou obter mais dados quanto ao seu sinal em meio a CT cujo experimento está em andamento.

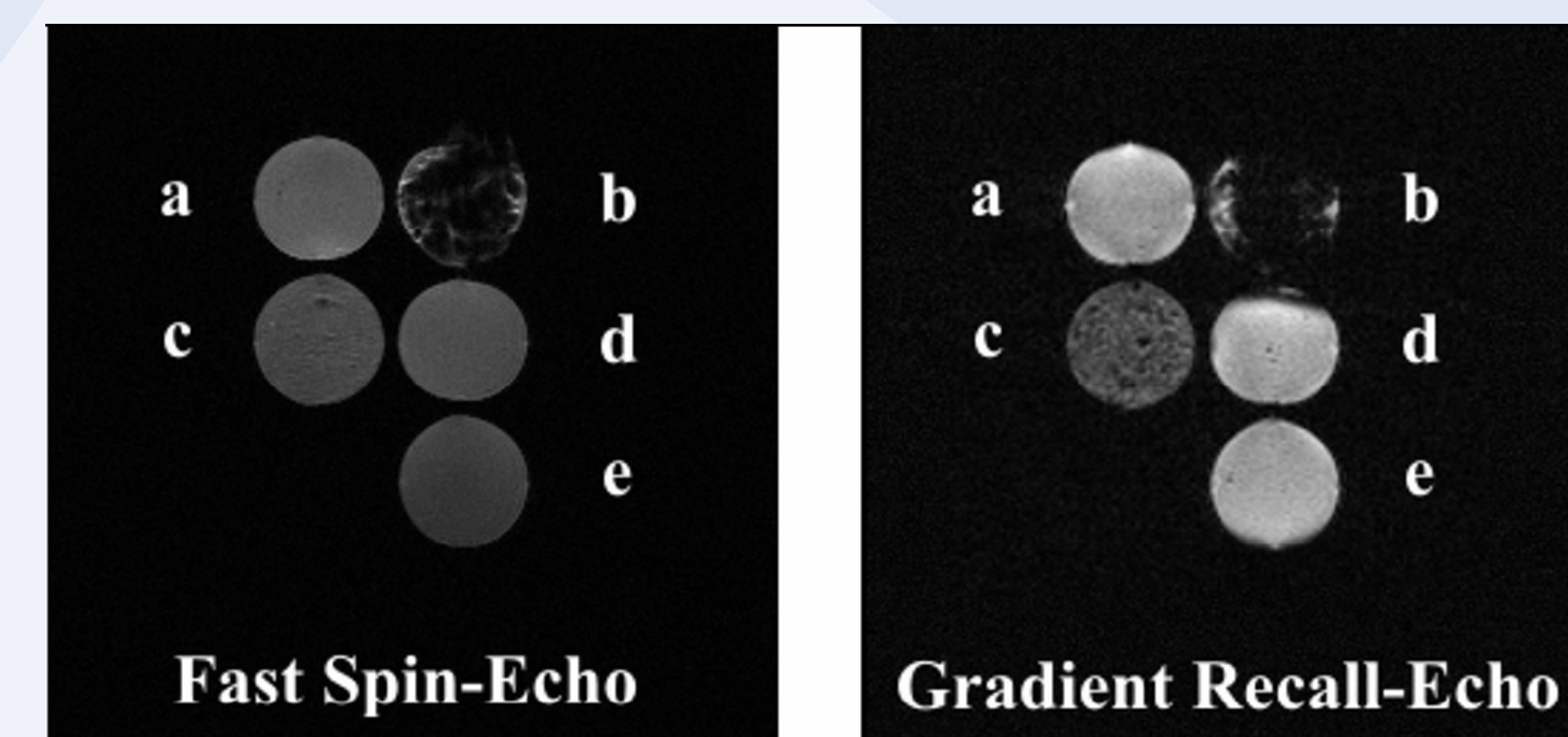


Figura 2- Testes de RM com as nanopartículas sintetizadas: (a) células HeLa em agarose, (b) NPs em agarose, (c) células HeLa com NPs incorporadas, (d) e (e) fundo de agarose.

CONCLUSÕES

De modo geral, os resultados obtidos foram satisfatórios, pois mostraram que há uma coerência entre sinal obtido para amostras que eram iguais quando a aquisição das imagens é feita sob os mesmos termos.

Para melhores resultados, a repetição dos experimentos sob as mesmas condições torna-se necessária para que possíveis erros e alterações nas características das amostras possam ser minimizados.

O software utilizado mostrou-se eficiente para a análise de imagens obtidas em equipamento de RM, porém, devido ao grande número de parâmetros retornados pelo programa, a escolha daqueles que seriam os mais apropriados ao projeto oferece certa dificuldade àqueles que não estão muito familiarizados com os dados estatísticos que são gerados. Outros softwares similares ao utilizado foram testados para possível obtenção de resultados e análise, mas o domínio dos mesmos ainda não foi alcançado.

Vale ressaltar que, ainda que a marcação em células possa ser detectada através do uso da RM, deve-se avaliar a toxicidade das mesmas às células, uma vez que as avaliações em RM foram feitas com células com características diferentes das CT, células HeLa que incorporaram facilmente as nanopartículas dado sua natureza, e das vezes que foram obtidas imagens com CT estas já encontravam-se mortas.