



ESTUDO DA MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM ÁCIDO HIALURÔNICO, INJETADAS EM RATOS WISTAR



Gabriel Peres¹, Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo², Prof. Dr. Paulo Kharmandayan³

¹Acadêmico de Graduação em Medicina 5º ano

²CO-ORIENTADORA, Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, HEMOCENTRO

³ORIENTADOR, Departamento de Cirurgia Disciplina de Cirurgia Plástica - FCM

Faculdade de Ciências Médicas,

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.



1. INTRODUÇÃO

Dentre as potenciais inovações, que poderão contribuir para a solução de diversos desafios da Medicina, associam-se estratégias de regeneração e engenharia de tecidos.

As células tronco, quer sejam as embrionárias (CTE), quer sejam as pós-natais - células tronco mesenquimais (CTM) - apresentam grande potencial terapêutico, devido a sua enorme capacidade de auto-reprodução e pluripotencialidade.

Ainda há diversas controvérsias ao uso de CTE, entre as quais se salientam as de origem religiosa, ética e legais, opiniões que devem ser consideradas e sedimentadas. As células tronco pós-natais, por outro lado, não suscitam problemas éticos relacionados ao seu uso e ainda são naturalmente imunocompatíveis. A obtenção de CTM pode se dar por meio de medula óssea (MO), sangue de cordão umbilical e por tecido adiposo (TA) lipoaspirado, entre outros meios.

Uma vez que estão presentes em várias partes do corpo humano, as cartilagens podem sofrer lesões em diversas situações. No tocante à abrangência da Cirurgia Plástica, é de grande interesse estudos, principalmente, sobre as cartilagens hialina e elástica. Cabe destacar, portanto, que muitos estudos - in vitro e in vivo estão caminhando para produção de cartilagens. Alguns trabalhos sugerem o uso de géis biodegradáveis como uma boa estratégia para fator de crescimento na diferenciação de CTM em condrócitos. Entre tais biomateriais, os hialuronatos, como o ácido hialurônico (AH), são competentes na reparação de cartilagens.

Nesse contexto, o TA representa uma alternativa para obtenção de CTM, uma vez que é derivado do mesoderma embrionário e contém uma população de células estromais heterogênea. Em poder destas CTM e na presença de fatores de indução linhagem-específicos, há a possibilidade de diferenciação destas em: células adiposas, cartilaginosas, musculares e osteogênicas.

2. OBJETIVOS

- Verificar, in vivo, os aspectos relacionados à migração e diferenciação de CTM suspensas em AH e injetadas em ratos Wistar.
- Identificar as diferenças entre as injeções contendo AH e CTM e as injeções controle (AH sem CTM).
- Avaliar a capacidade de migração das CTM para outros locais, secundários a lesão tecidual.
- Propor uma teoria explicativa para o observado, após análise histológica do material.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Amostra

Foram utilizados cinco ratos Wistar, machos, com peso variando entre 180 a 200g, a serem experimentados no prazo de um ano.

3.2. Obtenção de gordura

A gordura utilizada como fonte de células tronco foi proveniente de descarte nas cirurgias eletivas de lipoaspiração, em pacientes doadores, realizadas pela equipe da Disciplina de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.3. Extração de CTM

O tecido lipoaspirado foi lavado exaustivamente com PBS ("phosphate-buffered saline") para remover traves de tecido conjuntivo e hemácias. Para cada 10g de tecido, a proporção das substâncias para o tampão de digestão, que foi adicionado a seguir, era 20mg de colagenase tipo 1A, 200mg de albumina sérica bovina (BSA), 20ml de D-MEM Low Glucose e 10µl de gentamicina. A mistura foi tratada em banho-maria à

37°C por 30 minutos, agitando o recipiente a cada 5 minutos. Após a digestão completa do tecido, a reação foi interrompida com 10 ml de soro fetal bovino (FBS). A seguir, centrifugada por 15 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspenso em 10 ml de D-MEM Low Glucose com 10% do volume de FBS. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 3 dias consecutivos e depois a cada 2 dias até que as células aderidas ao plástico atingiram a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. As células foram retiradas da garrafa por adição de uma solução de tripsina a 0,05% e 1mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e expandidas até a 4ª passagem da cultura.

3.4. Imunofenotipagem das CTM através de citometria de fluxo

Após a purificação e expansão das células mesenquimais indiferenciadas estas foram caracterizadas fenotipicamente por meio de citometria de fluxo empregando um conjunto de anticorpos monoclonais específicos. Utilizaram-se os anticorpos CD 90 (Thy-1), CD105 (SH-2/endoglin), CD73 (SH3/SH4) e Stro-1 que correspondem aos antígenos de superfície expressos pelas células mesenquimais e os não expressos como CD34, CD45, CD14 e CD31 também foram utilizados.

Foram utilizadas 10⁵ células diluídas em 100µl de PBS e 5 µl de anticorpo específico em cada reação de marcação. Esta mistura foi mantida a 4°C por 30 minutos e protegida da luz. As células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS por meio de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos e fixadas em 500 µl de paraformaldeído 1%. Mantidas em geladeira até o momento da aquisição.

Os controles foram realizados a partir de amostras de células sem marcação para verificação de auto-fluorescência e células marcadas com isotipos controles correspondentes para verificação de marcação inespecífica. Foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur e a análise dos dados será realizada utilizando o programa CellQuest.

3.5. Marcação e Detecção das células com Bromodeoxyuridina (BrDU)

Para marcar as células implantadas, as culturas foram incubadas com BrDU 10 µmol L⁻¹ por 3 dias antes do transplante. Para detectar a marcação com BrDU as células fixas foram incubadas com HCl 2N por 20 minutos na temperatura ambiente para desnaturar o DNA. Em seguida, as culturas foram neutralizadas com 0.1 mol L⁻¹ de tampão de borato de sódio por 10 minutos, enxaguadas em PBS, e incubadas com o anticorpo monoclonal anti- BrDU (diluição 1: 000; Sigma) a 4°C durante a noite. Depois foram expostas ao IgG de cabra anti-rato TRITC-conjugated ou à IgM de cabra anti-rato HRP-conjugated (Chemicon). Para os testes de dupla coloração, as células foram coradas primeiramente com nestin (antisoro polyclonal, 1: 500; ABCAM) ou PGP9.5, e depois processadas para BrDU.

3.6. Marcação com nanopartículas de Ferro.

O processo utilizado para a transfeção das nanopartículas de ferro às células previamente marcadas com BrDU consiste, sinteticamente no abaixo descrito:

I. Utilizou-se meio sem antibiótico.

II. Preparação de soluções:

- Solução de SPIO = diluiu-se 150mg de nanopartículas em 1000ul álcool 100% sob ultrassom por 20 minutos.
- Solução A = meio de cultura sem antibiótico (1,5ml) + Lipofectin (1,25ul).
- Solução B = meio de cultura sem antibiótico

(1,45ml) + Solução de SPIO (50ul).

III. Adicionou-se a solução de SPIO à solução B

IV. As soluções ficaram em repouso por 10 minutos.

V. Misturar as soluções A e B. Homogeneizar. E deixar em repouso por 20 a 30 minutos. A concentração final de SPIO é de 50ug/ml, total de 3ml.

VI. Adicionar esse meio em células plaqueadas por 6 horas.

Controle: lipofectamina + volume de etanol 100% (50ul)

VII. Após 6 horas, retornam em meio normal sem antibiótico + SFB (10%).

VIII. Teste em lâminas com azul da Prússia.

3.7. Experimentação animal

3.7.1. Infusão celular

As CTM obtidas foram suspensas em AH (Ácido Hialurônico "Derma Hyal" - 1ml a 3% , 30 mg/ml, fabricado por Oftvision, Registro Anvisa n.º. 10291980020, adquirido com recursos próprios) na seguinte proporção: 1mL de solução salina contendo 1x10⁷ CTM / 1 mL de AH, ver figura 1.

Foi injetado 0,5 mL do material (portanto 2,5x10⁶ CTM em 0,25mL de AH), presentes na preparação acima, nos ratos, em região próxima à orelha esquerda dos ratos, figura 2.



Figura 1. Suspensão de CTM em AH



Figura 2. Injeção do preparo: CTM + AH.

Realizada discreta lesão em região contralateral, por meio de punção e retirada com agulha hipodérmica (idêntica àquela utilizada na infusão do material), com a hipótese de geração de alguma atividade inflamatória, o que teoricamente poderia contribuir para migração local de CTM.

Nos animais destinados e identificados como controle, foi injetado suspensão AH sem CTM, apenas com Soro Fisiológico 0,9%, mantendo a proporção, no local correspondente ao acima descrito com idêntica lesão.

Foi permitida a alimentação e livre movimentação dos animais nas suas gaiolas.

3.7.2. Obtenção de imagem por RNM

A RNM estava planejada para ser realizada em duas semanas contadas à partir da injeção do material, entretanto foi realizada em 5 semanas, por intercorrências logísticas.

Os animais foram anestesiados com Tribromoethanol, 300mg/kg, por via intra-peritoneal e alocados em caixa dimensionada para cinco animais, dentro de bobina de tamanho compatível com crânio humano, para análise por meio de imagens obtidas com RNM em busca de imagem correspondente às nanopartículas de ferro com que as CTM foram marcadas, *vide figura 3*.

AGRADECIMENTOS

Aos médicos residentes da Disciplina de Cirurgia Plástica FCM-UNICAMP, pela obtenção de gordura lipoaspirada.
Aos pós-graduandos Pedro Bordeaux, Thiago Borsoli e Adriana Silva Santos, pela etapa de obtenção e marcação das CTM.
Aos Profs. Delma Pegolo Alves e Marcos Zanfolin pela disponibilização, manejo e hospedagem dos ratos Wistar.
Ao Prof. Dr. Li Li Min e sua equipe pela disponibilização da RNM e todo apoio logístico.
Ao Prof. José Vassallo e ao Dr. Paulo Lutaif Filho pelo auxílio na análise histológica e imunohistoquímica dos materiais.

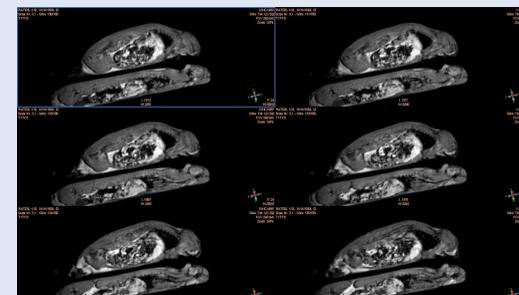


Figura 3. Preliminar de RNM dos ratos em que foram infundidas a suspensão de AH com CTM, marcadas com nanopartículas de ferro e BrDU.

3.7.3. Avaliação histológica

Após a tentativa de identificação do local contendo CTM marcadas com nanopartículas de ferro, por meio de RNM, após cinco semanas da implantação, os ratos foram sacrificados em câmara de CO₂ e as amostras de tecidos das regiões onde o material foi injetado foram cuidadosamente retiradas dos animais e imediatamente fixadas em formalina tamponada a 10% para estudo histológico e imunohistoquímico.

Após 15-24h de fixação em formalina tamponada, os tecidos foram processados até inclusão em parafina em histotécnico Leica modelo ASP-300 e no autoinclusor Leica - modelo EG1160.

Os blocos estão estocados para o término do experimento, cuja fase final, segue abaixo, com término programado para o segundo semestre.

Os cortes histológicos de 5µm serão realizados em micrótomo rotativo Leica modelo RM2125RT [aparelhos existentes no Laboratório de Investigação em Patologia/ Patologia Molecular, CIPED-FCM, adquiridos com o auxílio FAPESP 04/09500-7].

Para análise histológica, as lâminas serão coradas com hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson para fibras colágenas, Weigert-van-Giesson para fibras elásticas, impregnação argêntica de Gomori para fibras reticulínicas, reação de Periodic Acid Schiff (PAS) para glicogênio e glicoproteínas, azul de Alcian para mucinas e picrossirius para componentes conjuntivos.

3.7.4. Avaliação imunohistoquímica (BrDU)

Para identificação das CTM, as lâminas serão processadas com anticorpo para BrDU e analisadas por microscopia e individualmente, comparando-se com as demais lâminas utilizadas na análise histológica em busca das células com marcação positiva.

4. RESULTADOS PARCIAIS

Os resultados aqui apresentados são, por hora, parciais. De forma que podemos apresentar, somente as imagens obtidas em teste com RNM (figura 3.), onde não identificamos imagem compatível com a marcação de nanopartículas de ferro.

5. CONCLUSÃO

O que podemos concluir em posse dos resultados parciais obtidos é que as CTM, não podem ser visualizadas em RNM após cinco semanas, o que sugere que novos estudos são necessários para determinar o tempo ótimo para realização da RNM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Choi YS, Park S, Suh H. Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biomaterials* 2005; 26: 5855-5863
- Isojari N, Kusuhabara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillier J, Lowder E, Landis WJ. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng*. 2006 Apr;12(4):691-703.
- Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 2003 Aug;70(4):300-6.
- Pittenger MF, Mackay AE, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 1431-7.
- Stoichik MS, Mao JJ. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jan;119(1):71-83; discussion 84-5.
- Aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-UNICAMP), sob protocolo nº 1654-1 e adendo de protocolo nº 2221-1.
- Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (FCM-UNICAMP), sob protocolo nº 290/2008 e adendo aprovado em 2010.

