

# TRANSPLANTE ALÓGENO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E HIDROGEL PURAMATRIX NO REPARO DE LESÕES DO TENDÃO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO EM COELHOS: RESULTADOS PRELIMINARES

Benito Juarez Nunes Alves de **OLIVEIRA**<sup>1</sup>; Luiz Antônio Franco da **SILVA**<sup>1</sup>;  
Luiz Augusto de **SOUZA**<sup>1</sup>; Elisângela Paula de Oliveira **LACERDA**<sup>2</sup>;  
Flávia de Castro **PEREIRA**<sup>2</sup>; Marcelo Emílio **BELETTI**<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Clínica e Cirurgia Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, EVZ/UFG. email: [benito@ortoneurovet.com](mailto:benito@ortoneurovet.com)

<sup>2</sup> Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICB/UFG.

<sup>3</sup> Setor de Morfologia. Instituto de Ciências Biomédicas, ICBIM/UFU.

Palavras-chave: terapia celular, biomaterial, regeneração tendínea

## INTRODUÇÃO

As células da medula óssea são conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTMs), devido a sua capacidade de replicação e diferenciação em diversas linhagens celulares, como osteogênica, condrogênica, adipogênica, tenogênica e miogênica. Estas células apresentam atividade multipotencial, ou seja, se diferenciam em um ou mais tipos celulares especializados (JIANG et al., 2002).

O potencial regenerativo das CTMs vem sendo utilizado em modelos animais, para reparar e regenerar uma variedade de tecidos (BARRY e MURPHY, 2004). Entretanto, a reconstrução de tecidos não requer apenas células, mas também uma adequada estrutura ou biomateriais de adesão, para que essas células possam proliferar e interagir com fatores de crescimento específicos e citocinas. Contudo, a medicina regenerativa tem se tornado uma disciplina que une a biologia celular, a engenharia tecidual e a cirurgia para regenerar tecidos com células vitais, biomateriais e moléculas sinalizadoras (KRAMPERA et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial regenerativo das células-tronco mesenquimais alógenas cultivadas da medula óssea de coelhos, em associação ao biomaterial de hidrogelPuraMatrix, no reparo de lesões parciais do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados aleatoriamente 48 coelhos, machos, da raça Nova Zelândia, para serem submetidos ao procedimento cirúrgico de tenotomia parcial do

tendão do músculo gastrocnêmio e posterior inoculação de células-tronco mesenquimais (CTMs) alógenas cultivadas da medula óssea (MO), associadas ou não ao PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel (BD<sup>®</sup>Biosciences, São Paulo, SP). Esses foram distribuídos em quatro grupos, cada qual contendo 12 animais: o grupo controle (C) foi submetido apenas a tenotomia parcial do tendão do músculo gastrocnêmio; grupo G1 que, após tenotomia parcial, recebeu a inoculação no local da lesão de 10<sup>5</sup> CTMs cultivadas; o grupo G3 foi submetido ao implante do hidrogel PuraMatrix e o grupo G4 foi realizada a inoculação de 10<sup>5</sup> CTMs associada ao hidrogel. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o protocolo nº 220/09.

Nesta etapa do experimento, dez espécimes foram selecionados para ensaios pilotos, avaliando-se o rendimento e viabilidade das CMNs e das CTMs isoladas por nanopartículas magnéticas. Para colheita de MO, uma agulha metálica de Rosenthal 16G foi introduzida na epífise proximal do tubérculo umeral, sendo aspirados 8mL de MO com uma seringa de 10mL contendo solução heparinizada (1:500).

As amostras de MO foram acondicionadas em quatro tubos Falcon de 15mL, cada qual contendo 2 mL e diluídos (vol/vol, 1:1) em solução salina tamponada (DPBS, Gibco<sup>®</sup>Invitrogen, São Paulo, SP) acrescida de soro fetal bovino (SFB) a 10% e 10Mm EDTA. Posteriormente, as amostras foram lentamente depositadas sobre 2mL do gradiente de densidade Ficoll-Paque<sup>®</sup> PLUS 1.077 g/mL (Amersham Biosciences, São Paulo, SP). O sangue e o gradiente ficoll foram centrifugados a 495 x g por 30 minutos a 15°C e a fração de células mononucleares (CMNs) coletadas na interface entre o plasma e o ficoll.

Duas lavagens do sedimento celular foram realizadas com 10mL de PBS, e uma terceira lavagem com 10mL de meio de cultivo MesenCult humano completo (StemCell<sup>®</sup>, Vancouver, Canadá). Em todas as lavagens se realizou centrifugação a 493 x g por 10 minutos a 4°C. Uma alíquota de 10µL da suspensão celular foi diluída a 10µL do corante azul de trypan a 4 %. Essa suspensão foi depositada na câmara hemocitométrica de Neubauer para avaliação do rendimento e viabilidade de CMNs, utilizando microscopia óptica.

As CTMs foram obtidas da fração de CMNs pela depleção negativa das células hematopoiéticas, utilizando o anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, complexo tetramérico e nanopartículas magnéticas (EasySep, StemCell<sup>®</sup>). O tubo foi inserido na base magnética para seleção negativa das CTMs,

permanecendo em repouso durante 10 minutos. A seguir, esse tudo foi evertido e as células desejadas foram depositadas em um tubo falcon de 15mL. Uma nova contagem foi realizada em câmara de Neubauer para avaliar o rendimento e viabilidade de CTMs após seleção negativa por nanopartículas magnéticas.

As CTMs foram cultivadas em garrafas de cultura de tecidos de 25 cm<sup>3</sup>, imersas em meio MesenCult com SFB a 10%, gentamicina (25µg/mL) e anfotericina B (1µg/mL). Com 16 dias do cultivo, as células foram suspendidas com solução de tripsina a 0,25mg/mL, contadas em câmara de Neubauer para ajuste de 10<sup>5</sup> CTMs em 200µL de MesenCult<sup>®</sup> para serem inoculadas nas lesões tendíneas.

No presente estudo, foi avaliado somente o grupo controle (n=12) aos 45 e 90 dias, obtendo-se seis amostras em cada período. Para histologia, os tendões foram fixados em formalina tamponada a 10% e confeccionadas lâminas em secções transversais de 5µm, coradas com hematoxilina-eosina. Para processamento da microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, permanecendo *overnight* e posteriormente imersas em cacodilato de sódio a 0,2M.

Os resultados de rendimento e viabilidade celular foram avaliados por estatística de tendência central (média aritmética), sendo os histológicos e de MET por análise qualitativa do reparo tecidual.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

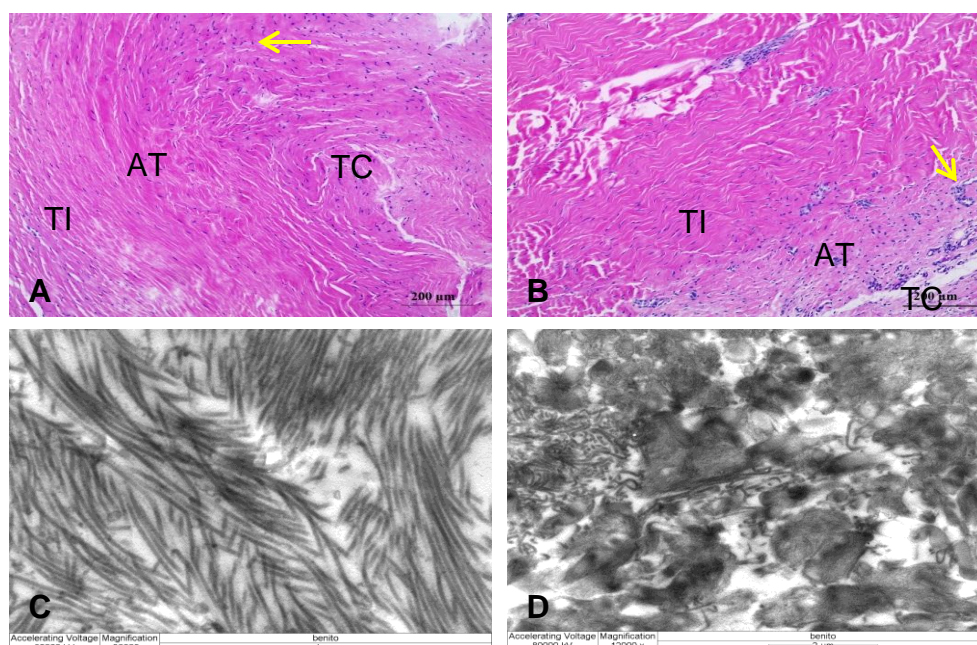
Os resultados de rendimento e viabilidade celular, averiguadas por contagem em câmara de Neubauer, estão expressos na tabela 1. Nesse estudo, observou-se um rendimento médio de 7,31 e 2,28 x 10<sup>6</sup> células/mL de CMNs e CTMs respectivamente, e esses resultados confirmam que as células de origem mesenquimal representam aproximadamente 30% do total de CMNs. OLIVEIRA, (2009) utilizou CMNs da MO de coelhos no reparo de lesões osteocondrais e encontrou rendimentos médios de 6,25 x 10<sup>6</sup> células/mL e viabilidade de 93,56%, utilizando o mesmo protocolo de isolamento celular. Portanto, os resultados apresentados no presente estudo foram superiores aos de OLIVEIRA, (2009), mesmo este obtendo um menor volume de aspirado de MO.

No grupo controle aos 45 e 90 dias, os cortes oblíquos dos tendões corados com H&E revelaram a presença de um tecido pobre em células e fibras colágenas organizadas, constituindo a porção íntegra do tendão. Já na área de cicatrização,

observou-se um tecido rico em células, porém com fibras menos organizadas (Figuras, 1A e B). Na avaliação pela MET também foram observadas fibras delgadas e desorganizadas (Figura 1C), bem como início de processo degenerativo de fibras colágenas na área de transição (Figura 1D).

**TABELA 1** –Rendimento e viabilidade de células mononucleares e células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de coelho antes e após a separação por partículas nanomagnéticas.

Amostras	Células mononucleares (CNMs)		Células-tronco mesenquimais (CTMs)	
	Rendimento (célis./mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilidade (%)	Rendimento (célis./mL x 10 <sup>6</sup> )	Viabilidade (%)
1	7,04	98,05	5,00	97,20
2	13,00	96,74	3,77	96,15
3	13,70	95,32	1,50	96,77
4	3,72	99,46	2,22	99,10
5	9,22	98,71	3,45	98,57
6	3,20	94,67	0,22	100
7	1,06	96,36	1,16	98,30
8	6,88	98,00	1,32	100
9	8,16	96,91	1,42	95,94
10	7,12	97,26	2,70	95,74
<b>Média</b>	<b>7,31</b>	<b>97,15</b>	<b>2,28</b>	<b>97,77</b>



**FIGURA 1** –Fotomicrografia dos tendões do grupo controle. Nos cortes histológicos, observa-se a área de transição (AT) entre o tecido íntegro (TI) e o tecido cicatricial (TC), este último composto de alta celularidade (setas amarelas) e fibras colágenas desorganizadas (A e B). A MET demonstrou formação de fibras colágenas delgadas e desorganizadas (C), em processo de degeneração (D).

Em um estudo avaliando o reparo do tendão patelar de coelhos com esponjas de colágeno e CTMs, JUNCOSA-MELVIN et al., (2006) observaram por histologia que, além da produção de colágeno tipo III e IV, houve um alinhamento das fibras colágenas quando comparado ao grupo controle. Portanto, a qualidade do tecido tendíneo formado no grupo controle do presente estudo, foi semelhante ao observado por JUNCOSA-MELVIN et al., (2006), o qual enfatiza a necessidade do uso de CTMs e biomateriais absorvíveis para um reparo qualitativo das fibras colágenas de tendões.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que na avaliação histológica e por microscopia eletrônica dos tendões submetidos à tenotomia parcial, do grupo controle aos 45 e 90 dias, o tecido neoformado demonstrou alta celularidade e com desorganização das fibras colágenas, essas em processo de degeneração. A avaliação dos outros grupos faz-se necessária na tentativa de desvendar a eficácia da reparação tendínea com CTMs e com o hidrogel PuraMatrix®.

## REFERÊNCIAS

- BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v.36, n.4, p.568–584, 2004.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALES, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, New York, v.418, n.6893, p.41-49, 2002.
- JUNCOSA-MELVIN, N.; BOIVIN, G.P.; GOOCH, C.; GALLOWAY, M.T.; WEST, J.R.; DUNN, M.G.; BUTLER, D.L. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. **Tissue Engineering**, Texas, v.12, n.2, p.369-379, 2006.
- KRAMPERA, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G.; FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendo and skeletal muscle repair. **Bone**, New York, v.39, n.4, p.678-683, 2006.
- OLIVEIRA, B. J. N. A. **Enxerto osteocondral alógeno associado á inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. Dissertação (Mestrado), 53p. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2009.