

AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA REPARAÇÃO TENDÍNEA EM COELHOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E HIDROGEL PURAMATRIX: RESULTADOS PARCIAIS

Jéssica Alves da Silva¹, Luiz Antônio Franco da Silva², Luiz Augusto de Souza²,
Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira², Morgana Pontes Abreu⁴,
Sabrina Lucas Ribeiro de Freitas⁴

Escola de Veterinária e Zootecnia/Universidade Federal de Goiás

E-mail: jj.syy@hotmail.com (Orientanda), lafranco@vet.ufg.com (Orientador)

Palavras-chave: colágeno, lesão tendínea, terapia celular

INTRODUÇÃO

O aparelho locomotor é um complexo sistema incluindo músculos, tendões, segmentos ósseos e articulações, que são controlados pelo sistema nervoso central, responsável pela locomoção (BARREY, 2001). Diante de tamanha complexidade, em Medicina Veterinária, é comum encontrar na rotina clínica e cirúrgica lesões que acometem os tendões, sendo os casos mais frequentes os de rupturas causadas por materiais perfuro cortantes ou por tensão excessiva em animais atletas. Este tipo de lesão acomete principalmente os cães (VAUGHAN, 1980), equinos (GOODSHIP, 1993) e os humanos (NYESTRON & HOLMLUND, 1983) e pode apresentar intercorrências durante o processo de reparação tecidual.

Portanto, a ação de reparação deste tecido envolve uma resposta inflamatória intensa com diversos fatores que dificultam a cicatrização (GOODSHIP et al., 1994). Assim, quando ocorre lesões extensas que comprometem grande parte da estrutura morfofuncional do tendão, muitas vezes, torna-se necessário o uso de terapias auxiliares. Dentre as utilizadas, as células-tronco mesenquimais vêm sendo exploradas com o desígnio de acelerar o processo cicatricial e substituir tecidos degenerados (COELHO et al., 2002). Estas células são consideradas multipotentes por possuírem a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens do tecido conjuntivo e promover a regeneração de órgãos e tecidos lesionados.

1.Orientada do projeto de iniciação científica (PIBIC); 2.Orientador ; 3.Doutorando ; 4.Aluno(a) de graduação em Medicina Veterinária.

-Revisado pelo Orientador-

Fazendo uma avaliação geral dos avanços obtidos na medicina regenerativa verifica-se que novas perspectivas tem surgido especialmente valorizando as terapias celulares e empregando o método ultra-estrutural por microscopia eletrônica na avaliação do processo de reparação. Assim sendo, o estudo da reparação tendínea e de outros tecidos desponta como uma ferramenta terapêutica a ser popularizada no tratamento de várias doenças crônicas degenerativas. Nesse caso o emprego das células-tronco mesenquimais da medula óssea e de fatores de crescimento que permitem organismo reparar o próprio tecido lesionado ganha um destaque especial (SANTOS et al., 2004), pois existe a possibilidade do método ser usado tanto no homem quanto nos animais.

OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do aparelho locomotor e suas limitações relacionadas ao diagnóstico e tratamento, optou-se pela realização deste estudo na expectativa de auxiliar na padronização de um novo protocolo terapêutico baseado nos resultados da microscopia eletrônica, para que futuramente os pacientes disponham de um tratamento mais consistente e qualificado. Assim, o objetivo principal desse trabalho foi estudar experimentalmente a reparação tendínea em coelhos após terapia com células-tronco mesenquimais alógenas empregando na avaliação o método ultra-estrutural por microscopia eletrônica e padronizar o cultivo celular: resultados parciais

METODOLOGIA

Foram selecionados 48 coelhos, machos, adultos, raça Nova Zelândia, clinicamente saudáveis, com aproximadamente 3,5Kg de peso corporal. Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos o GI (controle), GII (Tratamento com CTM), GIII (Tratamento com hidrogel PuraMatrix[®]) e GIV (Tratamento com hidrogel PuraMatrix[®] e CTM) com 12 unidades experimentais. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos no intuito de caracterizar dois momentos pré-estabelecidos de 45 e 90 dias de pós-operatório. Dentre as atividades propostas os dois últimos grupos ainda não foram operados, portanto os resultados apresentados são parciais. O projeto foi protocolado e recebeu o parecer favorável do comitê de ética sob o número 220/09.

Dentre as unidades experimentais apenas uma foi utilizada para a realização da colheita de medula óssea do úmero. Para tanto administrou-se como medicação pré-anestésica acepromazina (0,2mg/kg) e cloridrato de tramadol (2,0mg/kg). Na sequência os animais

foram anestesiados com administração de cetamina (30,0mg/kg) e xilazina (5,0mg/kg) por via intramuscular. Após tricotomia e anti-sepsia da região escápulo-umeral foi inserida uma agulha metálica de Rosenthal (16G) heparinizada e aspirados 8,0ml de medula óssea integra com seringa de 10ml contendo 0,2ml de solução estéril de heparina (5000U/ml).

Em capela de fluxo laminar o aspirado foi colocado em quatro tubos Falcon estéreis de 15ml e diluídos (volume/volume) em 2,0ml de solução salina tamponada (DPBS, Gibco® Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) acrescida de soro fetal bovino (SFB) a 10% e 10Mm EDTA (RoboSep, Stem Cell®, Vancouver, Canadá). Posteriormente cada amostra foi adicionada sobre 2,0ml de solução Ficoll-paque® Plus na densidade 1,077g/ml (Amersham Biosciences, São Paulo, SP, Brasil) contida em outro tubo. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 495 x g durante 30 minutos a 15°C e separadas em quatro porções distintas: plasma, nuvem celular, Ficoll-paque® e células vermelhas (Figura 1A).

As nuvens celulares foram transferidas para um único tubo Falcon de 15ml que foi centrifugado por mais duas vezes com 10,0ml de DPBS. Em seguida, uma terceira centrifugação foi realizada com 10ml de meio de cultivo Mesencult humano suplementado com soro fetal bovino a 10% (Stem Cells®) a 385 x g durante 10 minutos a 4°C. Na sequência, o meio foi desprezado e o sedimento celular ressuspensão em 1,0ml de meio de cultivo para contagem celular em câmara hemocitométrica por microscopia de luz. A viabilidade foi determinada por técnica de exclusão vital por azul de Tripán 4% (Figura 1B).

As células-tronco mesenquimais foram obtidas da fração mononuclear pela depleção negativa das células hematopoiéticas, utilizando o anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, complexo tetramérico e nanopartículas magnéticas, preparadas conforme a recomendação do fabricante (EasySep, Stem Cell®, Vancouver, Canadá). A amostra foi acondicionada em tubo de poliestireno inserido na base magnética para seleção negativa das células-tronco mesenquimais (Figura 1C). A seguir, o tubo foi evertido e as células-tronco mesenquimais depositadas em um tubo falcon de 15ml. Uma nova contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer para avaliar o rendimento e viabilidade.

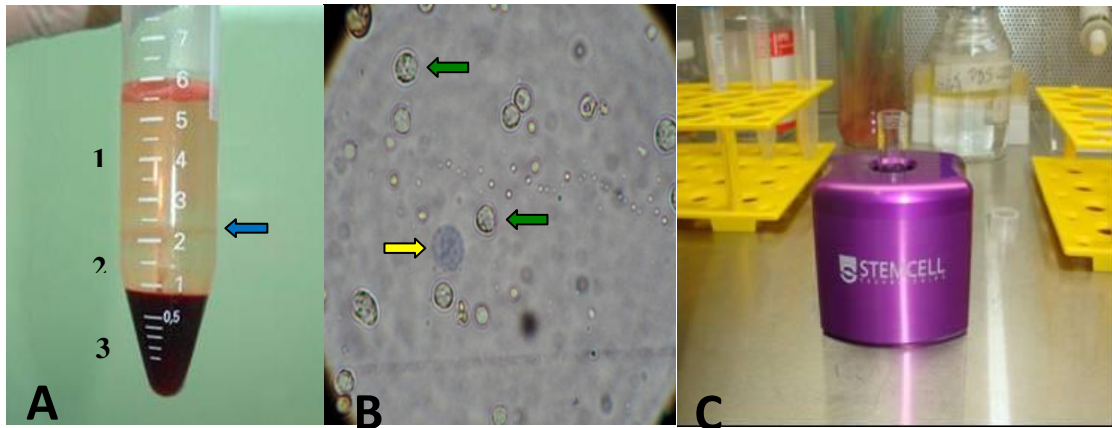


Figura 1. Obtenção das células-tronco mesenquimais. **(A)** Amostra de aspirado de medula óssea de coelhos após a separação por gradiente de densidade Ficoll-paque. Notar o anel celular (seta azul) situado entre o plasma (1) e o ficoll (2). Em (3) deposição de eritrócitos e polimorfonucleares no fundo do tubo. **(B)** Avaliação do rendimento e viabilidade celular em câmara de Neubauer, células viáveis (setas verdes) e células inviáveis com citoplasma corado com azul de tripan (seta amarela). Microscopia óptica (aumento 100x). **(C)** Base magnética para separação celular EasySep® utilizam anticorpos monoclonais específicos e nanopartículas magnéticas.

As células-tronco mesenquimais isoladas foram inicialmente cultivadas em garrafas de cultura de 25cm³ contendo 5x10⁵ células imersas em meio de cultivo MesenCult humano suplementado com SFB a 10%, gentamicina e anfotericina B. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e a primeira troca de meio para eliminação das células não-aderentes foi realizada 72 horas após o início do cultivo na qual apresentava várias colônias fibroblásticas aderentes. Posteriormente, o meio de cultura foi trocado a cada quatro dias e o crescimento celular avaliado diariamente em microscópio invertido. Quando as células atingiram 80-90% de confluência, foram subdivididas em garrafas de cultura de 150 cm³ após tratamento com tripsina/EDTA (0,25%) (Gibco-BRL). A concentração celular foi ajustada para 5,0x10⁵ células em 200µl de meio Mesencult para em seguida serem inoculadas nos defeitos tendíneos provocados experimentalmente.

As lesões nos tendões do ventre lateral do músculo gastrocnêmio foram realizadas no membro pélvico esquerdo dos coelhos sob efeito do mesmo protocolo anestésico utilizado

para a colheita da medula óssea. Após a exposição, o tendão foi individualizado e seccionado transversalmente de forma parcial, sendo removido aproximadamente 1,0cm de comprimento por 0,3cm de espessura. As unidades experimentais do grupo GI não receberam tratamento, correspondendo ao grupo com reparo fisiológico. Os animais do GII receberam inoculação de células-tronco mesenquimais alógenas no local da lesão tendínea. O grupo, GIII será tratado apenas implante do hidrogel PuraMatrix[®] e no GIV foi realizada a inoculação de 1×10^5 CTMs associada ao PuraMatrix[®], mas, essas atividades serão desenvolvidas na próxima etapa do experimento.

Quanto a técnica cirúrgica, após tenotomia parcial do tendão vasto lateral do músculo gastrocnêmio, o paratendão foi reconstituído com sutura simples continua com fio de poliglactina 910 n^o 4-0 para inoculação das células e em seguida a pele recebeu sutura simples interrompida com mononáilon n^o 4-0. Decorridos os períodos 45 e 90 dias de pós-operatório os animais foram submetidos à eutanásia, com sobredose de tiopental sódico 2,5% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Campinas, SP.) e cloreto de potássio 10% (Darrow Laboratórios S.A. Rio de Janeiro, RJ.) para colheita dos tendões operados. No estudo aqui desenvolvido a colheita de material foi realizada aos 45 dias de pós-operatório.

Para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2% por no mínimo 24 horas. Após desprezar o fixador, o tecido permaneceu imerso em tampão cacodilato por 24 horas a 4°C. Em seguida foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio 2% por duas horas a mesma temperatura. Na sequência, as amostras foram lavadas duas vezes em água bidestilada e desidratadas em gradiente de etanol em concentrações crescentes de 30, 50, 70, 80, 95 e 100% por duas vezes. A secagem realizada em secador de ponto crítico à base de dióxido de carbono e posteriormente as amostras incluídas em óxido de propileno e resina, recobertas com ouro. Secções ultrafinas transversais do tendão com 70 a 90nm de espessura foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão, verificando a distribuição e o diâmetro das fibrilas colágenas.

Todos os resultados das variáveis paramétricas foram submetidos à análise de variância. Para as variáveis não paramétricas foi efetuado teste de Kruskal Wallis e nível de significância de 5% ($p < 0,05$) seguido de teste de Tukey (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

As células-tronco mesenquimais obtidas da fração mononuclear pela depleção negativa das células hematopoiéticas em base magnética foram capazes de gerar células aderentes com diferentes morfologias, das quais estavam presentes células alongadas de aspecto fibroblastóide. Assim como, o meio de cultura Mesencult humano foi eficaz na expansão das células-tronco mesenquimais, contudo a adição de antimicrobianos e antifúngicos foi necessária.

Após a colheita das amostras tendíneas a análise ultra estrutural por microscopia eletrônica de transmissão foi empregada em cortes transversais, longitudinais e oblíquo para melhor avaliação do tecido. No corte transversal do grupo controle (GC) foi verificada a presença de grande variabilidade na espessura das fibrilas de colágeno mostrando predominantemente fibras colágenas espessas entremeadas por fibras delgadas (Figura 2A). Além disso, observações em cortes longitudinais ao microscópio eletrônico, também mostraram diferenças em relação à espessura destas fibrilas. As amostras do grupo controle apresentaram fibrilas em uma única direção, mas com aspecto entrelaçado aparecendo em diferentes níveis do plano do corte utilizado. Foi possível observar em corte oblíquo a constituição predominante de tecido conjuntivo denso, pobre em células e com fibras colágenas desorganizadas aos 45 dias de pós-operatório (Figura 2B).

Algumas amostras eram predominantemente ocupadas por tecido conjuntivo denso rico em células e com fibras menos organizadas delimitando a região de cicatrização. A área cicatricial em todas as amostras foi caracterizada por fibras colágenas delgadas e desorganizadas (Figura 2C). No entanto, foi possível notar que essas regiões eram ricas em células, porém com menos fibras colágenas. Algumas amostras apresentaram áreas em processo de degeneração observadas principalmente na transição entre o tendão sadio e a área em processo de reparação. Assim como, regiões com alta concentração de fibras colágenas “ninhos” indicando o processo de formação de novas fibras.

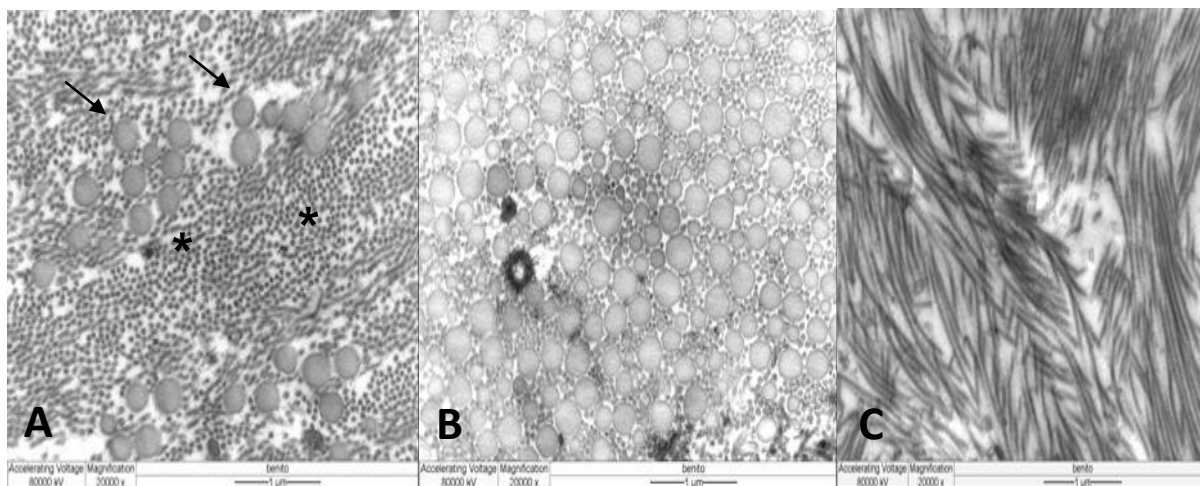


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica. Notar (A) Corte transversal do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos após tenotomia parcial sem a utilização de tratamento (GI) aos 45 dias de pós-operatório. As setas indicam fibras colágenas espessas entremeadas por fibras colágenas delgadas (asteriscos). Em (B) Corte oblíquo, observar à esquerda tecido conjuntivo denso pobre em células e com fibras colágenas bem organizadas. À direita existe um tecido conjuntivo denso, porém mais rico em células e com fibras menos organizadas caracterizando região de cicatrização. A imagem (C) representa uma área de cicatrização formada por fibras colágenas delgadas e desorganizadas.

DISCUSSÃO

Inicialmente, fazendo breve comentário sobre o local de aspiração da medula óssea optou-se neste experimento, pela colheita no tubérculo umeral devido à facilidade na obtenção de grande volume do aspirado e na padronização do traumatismo gerado pela punção. A colheita da medula foi simples, porém dependente do protocolo anestésico. Para tanto, seringas e agulhas foram heparinizadas para prevenir entupimento e coagulação das amostras. Segundo MUSCHLER et al. (1997), existe a possibilidade de coagulação da amostra quando não for utilizado a heparina e de o anticoagulante lesar as células medulares, entretanto, não foi determinado à necessidade e o volume adequado conforme estipulado no presente estudo. Em relação aos locais da aspiração da medula óssea foi citado em outros trabalhos como o de GRINDEM, et al. (2002), a crista ilíaca, o trocanter maior do fêmur e o tubérculo maior do úmero.

A técnica descrita de separação da fração de células mononucleares da medula óssea de coelhos foi eficaz corroborando com os achados de SOUZA (2009). Porém o referido autor

não empregou a porção celular adquirida em meio de cultura específico. Segundo STRAUER & KORNOWISK, (2003), a quantidade de células-tronco encontradas na medula óssea é de apenas 0,05% do total de células o que justifica a utilização de alternativas para aumentar o número de células por meio de expansão em cultivo celular. Pois o aumento da quantidade de células resulta em um maior aproveitamento das amostras e maiores chances de sobrevivência no local. Por essa razão optou-se no presente experimento pelo cultivo celular.

Um dos achados importantes do presente estudo está relacionado ao cultivo celular, metodologia nem sempre de fácil aplicação. Todavia após várias tentativas, as células-tronco mesenquimais obtidas da fração mononuclear pela depleção negativa das células hematopoiéticas em base magnética foram capazes de gerar células aderentes com diferentes morfologias, das quais estavam presentes células alongadas de aspecto fibroblástico. No trabalho de ALEXANDRE, (2007) foi utilizado o mesmo método de depleção negativa, porém obteve-se da fração mononuclear células hematopoiéticas e não mesenquimais. Esse resultado foi considerado um avanço conseguido dentro do processo de terapia celular. Outro aspecto importante está relacionado ao meio de cultura. Na pesquisa em questão, o meio de cultura Mesencult humano foi eficaz na expansão das células-tronco mesenquimais, contudo a adição de antimicrobianos e antifúngicos foi necessária. Ainda assim foi necessário repetir a operação por várias vezes, pois ocorreram contaminações.

Por meio da microscopia eletrônica observou-se no grupo controle uma região cicatricial caracterizada por alta densidade de fibras colágenas delgadas e desorganizadas, como encontradas no trabalho de TOVAR, (2009) que mostrou nos tendões do grupo controle (G1) após o procedimento cirúrgico, fibras colágenas finas, ramificadas com perda do arranjo, quando comparadas com as fibras colágenas do tendão normal, propondo que a cicatrização natural por si só não é suficiente para restabelecer uma estrutura organizada comparada a do tecido não lesionado.

Fundamentando-se nos resultados obtidos, em especial no fato de algumas amostras se apresentarem ocupadas por tecido conjuntivo denso rico em células e com fibras menos organizadas delimitando a região de cicatrização além de área cicatricial em todas as amostras contendo fibras colágenas delgadas e desorganizadas pode-se reafirmar a necessidade de empregar meios auxiliares de reparação tendinea. Sobre esta situação basta observar que foi possível notar que tais regiões eram ricas em células, porém com menos fibras colágenas, inclusive algumas amostras apresentando áreas em processo de degeneração, principalmente na transição entre o tendão sadio e a área em processo de reparação. Portanto, diante desses

resultados preliminares e considerando os achados de PELLED et al., (2004) é possível que a terapia celular possa auxiliar no processo de reparação tendínea em coelhos. Portanto, após concluir as análises dos grupos III e IV, espera-se que os grupos que receberão os tratamentos apresentem maior quantidade de fibras colágenas organizadas e arrançadas em feixes de fibras dispostas longitudinalmente ao maior eixo do tendão.

CONCLUSÕES

Analisando os resultados preliminares do material colhido referente ao grupo controle verificou-se que as imagens obtidas pelo exame de microscopia eletrônica de transmissão indicavam áreas de maior concentração celular e fibras desorganizadas, observadas no local da lesão. Além disso, ficou comprovado que é possível realizar o cultivo celular, porém pode haver contaminações, mesmo empregando antimicrobianos, situação limitante nessa modalidade de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE C. S. As células linhagem negativa (Lin-) de medula óssea atenuam a progressão da doença renal crônica. 102f. **Tese Doutorado** .Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- SP. 2007.

BARREIRA, A.P.B. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica, histopatológica e imunoistoquímica. 98f. **Dissertação(Doutorado)** .Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2005.

BARREY, E. Inter-limb coordination: Equine locomotion, London: Saunders, 2001. p. 77-94.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A.P.E; DEFFUNE, E. Isolamento das células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.22-24. 2006.

COELHO, C.; CARRAZONI, P.; MONTEIRO, U.; MOTA, A.; MELO, F.A.D.; FILHO, F.T. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, p.11-13, 2002.

GAO DY, CRITSER JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR J.**2000; v41, n4, p187. 1996.

GOODSHIP, A.E. The pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Cambridgeshire, v.5, p.23-29, 1993.

GOODSHIP, A.E.; BIRCH, H.L.; WILSON, A.M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.10, p.323-349, 1994.

GRIDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. *Veterinary Clinics of North America: **Small Animal Practice***, Philadelphia, n.32, p.1313-1374, 2002.

LEE M.W, YANG M.S, PARK J.S, KIM HC, KIM YJ, CHOI J. Isolation Of Mesenchymal Stem Cells From Criopreserved Human Umbilical Cord Blood. **Int J Hematol.** v81, n2, p126-130. 2005

MUSCHLER, G.V.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.79A, n.11, p.1699 -1709, 1997.

NYSTROM, B.; HOLMLUND, D. Experimental evaluation of immobilization in operative and non operative treatment of achilles tendon. A radiographic study in the rabbit. **Acta Chirurgica. Scandinavica**, Stockholm, v.149, p.669-673, 1983.

OLIVEIRA, P.G.G. Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos: avaliação a longo prazo – 120 dias, 2008, p19 p24. **Dissertação de mestrado**, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

PELLED G; Hoffmann A; Eberle P; Zilberman Y; Turgeman G; Gazit Z; Gross G; *Gazit D. Skeletal Biotechnology Laboratory, Hebrew University- Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel. **50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society**. Poster No: 0346

RABIN Y, STEIF PS, TAYLOR MJ, JULIAN TB, WOLMARK N, An experimental study of the mechanical response of frozen biological tissues at cryogenic temperatures cryobiology.1996.v33, n472, p82.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária**, 1998. 221p.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.37, n.6, p.490-495, 2004.

SOUZA, L.A. Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

STRAUER BE, KORNOWISK R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**. 2003, v107, n929, p34.

TOVAR M C H. Implantes De Matrizes De Colágeno Isoladas Ou Associadas Às Células Estromais Mesenquimais Multipotentes Autólogas Na Reparação Tendínea Em Ovinos. 2009 1v. 76p. **doutorado**. Universidade Est.Paulista Júlio De Mesquita Filho/Jaboticab. - Cirurgia Veterinária

VAUGHAN, L.C. Tendon injuries in dogs. **California Veterinary**, Nevada, v.1, p.15-19. 1980.