

Consórcio Setentrional de Educação a Distância
Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás
Curso de Licenciatura em Biologia a Distância

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, ISOLAMENTO,
PROLIFERAÇÃO E TRATAMENTOS: REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

KATHERYNE KRAUTHEIN

BRASÍLIA/DF

2011

[Digite texto]

Consórcio Setentrional de Educação a Distância
Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás
Curso de Licenciatura em Biologia a Distância

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, ISOLAMENTO,
PROLIFERAÇÃO E TRATAMENTOS: REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

KATHERYNE KRAUTHEIN

KATHERYNE KRAUTHEIN

Monografia apresentada como exigência parcial para a obtenção do grau pelo Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília/Universidade Estadual de Goiás, no curso de Licenciatura em Biologia a distância.

BRASÍLIA/DF

2011

[Digite texto]

KATHERYNE KRAUTHEIN

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, ISOLAMENTO,
PROLIFERAÇÃO E TRATAMENTOS: REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Biologia do Consorcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília/Universidade Estadual de Goiás.

Aprovado em 11 de Junho de 2011.

Prof. Esp. Leandro Dias Teixeira
Universidade de Brasília
Orientador

Prof. Msc. Lanuse Caixeta Zanotta
Universidade de Brasília
Avaliadora

Prof. Paula Marcela Duque Jaramillo
Universidade de Brasília
Avaliadora

Brasília-DF

2011

[Digite texto]

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho à Ana Cristina, minha zelosa mãe, pela constante compreensão e incondicional apoio dispensados à mim durante esta interminável empreitada, à minha querida irmã Karyn, meus familiares e amigos pelos vários momentos em que precisaram abrir mão de minha presença e que souberam administrar e aturar meus rompantes de impaciência e meus longos períodos de estresse. Ao meu saudoso pai, Roni Krauthein, que mesmo em memória serviu de espelho e inspiração nos momentos de angústia e aflição. Com imenso carinho, amor e grande gratidão que lhes dedico este trabalho. É em grande parte graças a vocês e principalmente a Deus que hoje alcanço meu objetivo.

[Digite texto]

Resumo

Este trabalho reúne pesquisas científicas sobre tratamentos atuais em diversos tecidos com células-tronco mesenquimais. Aponta as definições de organismos celulares, tipos de tecidos, diferenciação entre os tipos de células-tronco (embrionárias e adultas), sua potencialidade e formas de isolamento e proliferação. O foco principal são células-tronco mesenquimais adultas obtidas de diversos tecidos, e sua capacidade em transformar-se no tecido alvo lesionado, mesmo quando este não é de origem mesenquimal, a partir de fatores biológicos (citocinas e biomoléculas). Distingue a eficiência de dois tipos de meios de cultura (DMEM – alta concentração de glicose e Knock-out DMEM) a fim de definir a forma mais hábil para proliferação e utilização em terapias teciduais. Conclui-se que há aceleração e eficácia nos tratamentos quando utilizada células-tronco mesenquimais.

Palavras chave: células-tronco mesenquimais, tratamentos teciduais, DMEM.

[Digite texto]

Abstract

This work gathers scientific researches about current treatments on various tissues with mesenchymal stem cells. Points the definitions of cellular organisms, tissue types, differentiation between types of stem cells (embryonic and adult), their potential and form of isolation and proliferation. The main focus are adult mesenchymal stem cells obtained from several tissues, and their capacity of becoming the injured target tissue even when this has not a mesenchymal origin, from biological factors (cytokines and biomolecules). Differentiates the efficiency of two different culture methods (DMEM – high glucose concentration and Knock-out DMEM) to define the best way to proliferation and being utilization in tissue therapy. Concluding on a striking acceleration and effectiveness on the treatments when mesenchymal stem cells are utilized.

Keywords: mesenchymal stem cells, tissue treatments, DMEM.

[Digite texto]

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1.....	6
Figura 2.....	9
Figura 3.....	11
Figura 4.....	13
Figura 5.....	14
Figura 6.....	15
Figura 7.....	18

[Digite texto]

LISTA DE SIGLAS

- CT – Célula-Tronco
- CTM – Célula-Tronco Mesenquimal
- DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

[Digite texto]

SUMÁRIO

Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Sumário de Figuras.....	VI
Lista de Siglas.....	VII
Introdução.....	1
Objetivos Gerais.....	2
Objetivos Específicos.....	2
Metodologia.....	2
Revisão Bibliográfica.....	2
• Citologia: Célula Eucarionte.....	2
• Histologia: Tecidos Básicos.....	3
• Células-Tronco: Tipos e Classificações.....	4
• Células-Tronco Mesenquimais: Isolamento, Proliferação e Diferenciação..	6
• Células-Tronco e Reparação Tecidual.....	9
• Tratamentos com Células-Tronco Mesenquimais.....	11
Conclusão.....	19
Referências Bibliográficas	20

[Digite texto]

Introdução

Todo ser vivo é composto estruturalmente por unidades funcionais - as células - podendo ocorrer isoladamente (nos seres unicelulares) ou formando arranjos complexos nos seres pluricelulares, (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Basicamente, existem dois tipos de células, que são divididas em duas categorias, diferenciadas por sua organização e complexidade nuclear e organóide, sendo as células procariontes e eucariontes (COOPER & HAUSMAN, 2007). As células procariontes são pobres em membranas, sendo essencialmente constituída apenas pela membrana plasmática e poucas organelas, onde o material genético fica livre no citoplasma, mas esse tipo celular não será aprofundado nesse trabalho (STORER et. al., 2003). Os tecidos que compõe os organismos multicelulares se caracterizam pela presença de células e matriz extracelular. Entre os tecidos há o epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso (GARTNER & HIATT, 1999).

Entre as células dos tecidos temos as células-tronco, que são células indiferenciadas e podem ser classificadas, quanto ao tipo, em: células-tronco embrionárias e adultas. As adultas são células que já sofreram algum tipo de diferenciação e esperam por estímulos para terminar sua distinção e transformarem-se no tecido necessitado (SILVA et. al., 2010). Mesmo sabendo da totipotência das CT's embrionárias, deve-se observar com cautela a funcionalidade e plasticidade das CT's adultas, principalmente por não ter que passar por questões éticas ou religiosas, demonstrando que algumas linhagens são muito eficazes na diferenciação em outros tecidos. Especialmente as CT's mesenquimais (CTM's), que se caracterizam muitas vezes como uma CT embrionária, porém com capacidade reduzida (JAZEDJE et al., 2009), podendo se diferenciar em tecidos mesodermis e não mesodermis (MONTEIRO et al., 2009).

O isolamento de CT's adultas, feito por Bittencourt e colaboradores (2006), serviu para definir qual seria o melhor meio de cultura para sua proliferação, conduzida em dois meios de cultura diferentes, sendo o meio Knock-out DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) e o meio DMEM - alta concentração de glicose. O resultado demonstrou que o meio de cultura Knock-out DMEM teve uma rápida proliferação das CTM's, sendo mais eficaz e hábil em comparação ao meio de cultura DMEM - alta concentração de glicose e estudos recentes sobre o

[Digite texto]

comportamento imunológico das CTM's mostram avanços no uso terapêutico pela possibilidade de tratamento alógeno (MONTEIRO et al. 2009).

Objetivos Gerais

Este artigo de revisão visa explicitar formas de isolamento, proliferação e tratamentos com o transplante de células-tronco, procurando reunir trabalhos atuais publicados sobre o assunto de forma a esclarecer conceitos e a utilização terapêutica das células-tronco adultas mesenquimais.

Objetivos Específicos

- Definir e conceituar o que são células-tronco, diferenciando-as em seus tipos e potencialidades.
- Identificar tipo de isolamento e proliferação das células-tronco para uso terapêutico.
- Discorrer sobre tratamentos em tecidos com células-tronco mesenquimais.

Metodologia

Este trabalho foi baseado em artigos científicos recentes, teses de mestrado e doutorado, trabalhos de conclusão de curso e livros, encontrados em banco de dados, bibliotecas virtuais e de universidades, para elucidar toda a introdução e revisão bibliográfica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Citologia: Célula Eucarionte

As células eucariontes são células mais complexas quando comparadas às procariontes, onde há organelas especializadas e um núcleo bem delimitado por carioteca. As organelas trabalham organizadamente a fim de produzir todos os elementos necessários, a partir de processos metabólicos, garantindo a eficiência celular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Ainda segundo o autor, as células eucariontes quando agrupadas formam os tecidos básicos constituintes dos organismos complexos. Os tecidos básicos, ou primários, humanos são: tecido epitelial, ou de revestimento, tecido conjuntivo (e suas especializações), tecido nervoso e tecido muscular. Todas as

[Digite texto]

células dos diferentes tecidos estão sob controle de citocinas, sinalizadores bioquímicos e hormônios, que comandam todas as ações intra e extra-celulares.

Histologia: Tecidos Básicos

A maioria dos tecidos se caracteriza pela presença de células e matriz extracelular (composta basicamente de água e fibras, que auxilia no transporte de substâncias), a exceção está no tecido epitelial onde é ausente ou há pouquíssima matriz extracelular. Cada tecido tem formas e funções muito distintas um dos outros, como tecido epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso (GARTNER & HIATT, 1999)

O tecido epitelial tem como função revestir ou secretar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008), sendo denominadas de revestimento ou glandular, tendo como característica pouca, ou quase nenhuma matriz extracelular. Quando de revestimento tem origem embrionária ectodérmica (MONTAGNER & CORRÊA, 2004), quando glandular tem origem mesodérmica. Normalmente são células poliédricas, justapostas, aderidas firmemente uma às outras, podendo se apresentar em formato cubóide ou cilíndrico. Possui uma lâmina basal que faz a junção do tecido epitelial com o tecido adjacente, que normalmente é tecido conjuntivo (OLIVEIRA et al., 2002).

O tecido conjuntivo é altamente especializado, se diferenciando em categorias distintas, como tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo e sanguíneo. Mas, também há o tecido conjuntivo propriamente dito, ou conectivo (Timm, 2005). As principais funções desse tecido é unir e manter ligado as partes do corpo e atuar como barreira de defesa. Sua origem embrionária é mesodérmica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Na maioria dos animais o tecido mais farto é o muscular, composto por células alongadas, denominadas fibras. Sua origem embrionária é mesodérmica. Esse tecido tem como função a movimentação corporal em geral, a fisiologia muscular utiliza dois distintos tipos de unidades motoras, a fásica (ou dinâmica) constituída de fibras longas e a tônica (motora), constituída de fibras curtas (BIENFAIT, 1995).

Segundo trabalho de Cordeiro (1996) o *“sistema nervoso é o mais complexo e diferenciado do organismo, sendo o primeiro a se diferenciar embriologicamente e o último a completar o seu desenvolvimento.”* O tecido nervoso

[Digite texto]

é composto de dois tipos celulares, sendo os neurônios e as células da glia (ou neurógliã), em que os neurônios são sua unidade fundamental (MACHADO, 2000).

Células-tronco: Tipos e Classificação

Ultimamente muito tem se falado sobre as células-tronco (CT's), esse assunto não sai da mídia e tem se tornado uma especulação mundial. Existem vários trabalhos publicados sobre o tema e há muita expectativa em obter novidades em tratamentos. CT's são células com potencial de se diferenciar em diversos tecidos e se auto-replicar, a partir de estímulos ambientais e da necessidade das células marginais (HOCHEDLINGER & JAENISH., 2003; KIRSCHSTEIN, 2001). Quanto à biotecnologia, essas células indiferenciadas, podem ser classificadas, quanto ao tipo, em: células-tronco embrionárias e adultas. As adultas podem ser encontradas no cordão umbilical, placenta e medula óssea, como também em diversos tecidos animais. As três primeiras são constantemente utilizadas em tratamentos medicinais, sendo que a medula óssea tem menor potencial de rejeição. As CT adultas são células que já sofreram algum tipo de diferenciação e esperam por estímulos para terminar sua distinção e transformarem-se no tecido necessitado (SILVA et. al, 2010). Por outro lado as CT's embrionárias são células mais potentes, obtidas na fase embrionária, com total potencial de se diferenciar em qualquer outra célula de todos os tecidos animais existentes. Essas células ainda estão em teste para tratamentos medicinais (DEL CARLO et. al, 2009; SILVA et. al, 2010).

Conforme sua potencialidade, as CT's são classificadas em toti, pluri ou multi, oligo e unipotentes. As totipotentes são CT's capazes de originar qualquer célula embrionária ou extra-embrionária, como todos os tecidos que formam o corpo humano. As pluripotentes e multipotentes são células que podem se diferenciar em quase todos os tipos de células, as pluri são originadas da massa interna do blastocisto e as multi dão origem exclusivamente um subgrupo de famílias teciduais (como exemplo as CT's mesenquimais e neurais). As CT's oligopotentes são ainda mais restritas, gerando poucos tecidos e as unipotentes geram apenas um tipo de tecido (SCHWINDT et al., 2005; SILVA et al., 2010).

Como já citado, existem várias formas de coleta de CT's, porém as mais aptas para tratamentos são retiradas de pré-embriões, entretanto, por questões éticas e religiosas há grande proibição na maioria de países para utilização dessa fonte, mesmo vinda de embriões não aptos para implantação e nidação

[Digite texto]

(YAMANAKA, 2007). No Brasil há grande controvérsia nas pesquisas, pois é autorizada a retirada e pesquisa de células advindas de blastocistos, porém não é permitido o emprego terapêutico em humanos. Isso faz com que pouco se saiba sobre sinalizações celulares e a interação molecular de tais células com tecidos (DEL CARLO et al., 2008).

Mesmo sabendo da totipotência das CT's embrionárias, observa-se com cautela a funcionalidade e plasticidade das CT's adultas, além de não ter que passar por questões éticas e religiosas, podendo gerar muitas pesquisas para avanços na área, algumas linhagens são muito eficazes na diferenciação em outros tecidos. Especialmente CTM's, que são células raras, escassas, com grande aceitabilidade e habilidade para se diferenciar em colônias progenitoras de diversos tipos de tecido. Caracterizando-se, mesmo retirada de indivíduos adultos, como uma CT embrionária, que embora possua capacidade reduzida de diferenciação, pode ser considerado um avanço tecnológico, pela possibilidade do uso terapêutico. Jazedje e colaboradores (2009) confirmaram essa teoria após pesquisa com CTM's extraídas de tubas uterinas que em cultura se diferenciaram em diversos tipos de tecidos como: músculo, cartilagem, gordura e osso (*in vitro*).

Há inúmeras moléculas sendo expressas pelas CTM's, como moléculas bioativas, moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento. Essas expressões permitem interações com as outras células, controlando respostas inflamatórias, angiogênese e a proliferação de células envolvidas na reparação tecidual. Entre todos os tipos de CT's adultas as CTM's são as que apresentam maior plasticidade, podendo se diferenciar em tecidos mesodermis e não mesodermis (MONTEIRO et al., 2009). (Figura 1).

[Digite texto]

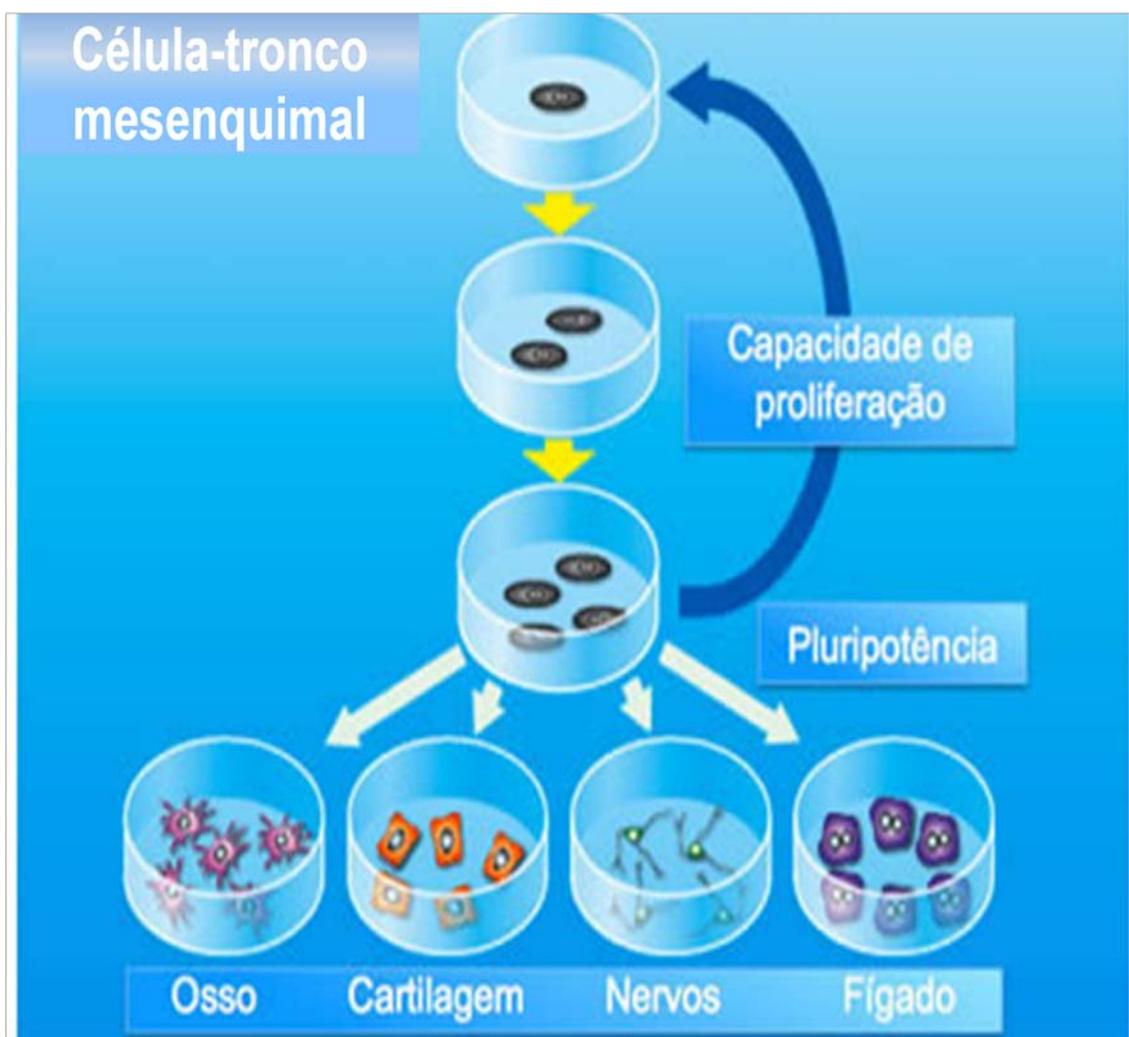


Figura 1: elucidação da potencialidade das CTM's.

Fonte: <http://www.cellvet.com.br/index.php?id=4&subid=2>

Células-tronco mesenquimais: Isolamento, Proliferação e Diferenciação

Devido entre as CT's adultas as CTM's em pesquisas demonstrarem maior plasticidade podendo gerar tecidos mesodermis e não mesodermis (DEL CARLO et al., 2009), o trabalho as detalhará quanto as suas diferenciações, isolamento e proliferação e tratamentos já pesquisados e publicados. As CTM's são células do estroma medular, precursoras de colônias fibroblásticas, sendo CT's não-hematopoiéticas, caracterizando-se multipotentes que se fixam a placas de cultura (BITTENCOURT et al. 2006).

Há dois tipos de diferenciação das CTM's propostos na literatura, a transdiferenciação e a fusão. A partir da transdiferenciação podem gerar dois tipos de linhagem de células distintas, quando ocorre de forma direta modifica seu

[Digite texto]

citoesqueleto e sua síntese protéica, ou de forma indireta, regredindo para uma CT mais primitiva para posteriormente tornar-se outro tipo celular. A outra diferenciação proposta é a fusão, procedimento biológico vastamente conhecido, onde as CTM's se diferenciam após fundirem-se as células alvo adultas, adquirindo o padrão de expressão gênica da célula alvo (MONTEIRO et al., 2009).

As CTM's encontradas em diversos tecidos são sempre raras e escassas, no caso do estroma medular apresentam-se em 1 a cada 34.000 células nucleadas na medula óssea humana (WEXLER et al., 2003). As células tronco mesenquimais já foram isoladas de diversos locais, como sangue de cordão umbilical humano, sangue, derme, osso trabecular, pulmão, polpa de dentes e ligamento periodontal (MACIEL, 2010) e tubas uterinas (JAZEDJE et al., 2009), sugerindo que estas células estão ampla e diversamente distribuídas *in vivo*. Todo organismo apresenta em suas células biomoléculas (marcadores de superfície) que diferenciam cada tipo celular e suas singularidades. Entretanto, as CTM's quase não expressam marcadores imunofenotípicos, sendo realizados seu reconhecimento através de antígenos de superfície por anticorpos monoclonais, já que expressam alguns marcadores específicos e não específicos (MONTEIRO et al., 2009).

A presença do marcador Stro-1 (estroma de suporte da hematopoese) é a melhor evidência de comparecimento das CTM's quando se deseja identificá-las a meio tantas outras células. Porém, quando o meio de cultura se propaga esse marcador é gradativamente perdido. Ainda assim, na literatura corrobora a idéia de que as CTM's não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais. Os marcadores moleculares constantemente presentes na superfície de CTM's extraídas da medula óssea são: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endogлина: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA- β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1 e Sca-1. Contudo, a distinção entre CTM's e CT's hematopoiéticas se dá pela ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 em sua superfície (MONTEIRO et al., 2009).

Bittencourt e colaboradores (2006) após isolarem CT's do estroma medular ósseo fizeram testes para definir qual melhor meio de cultura para proliferação e posterior uso terapêutico em transplantes para tecidos acometidos por avarias. A pesquisa foi realizada com dois meios de cultura diferentes, sendo o meio Knock-out DMEM e o meio DMEM - alta concentração de glicose. A conclusão do

[Digite texto]

experimento demonstrou que o meio de cultura Knock-out DMEM teve uma rápida proliferação das CTM's em comparação ao meio de cultura DMEM – alta concentração de glicose, onde as células se multiplicaram e formaram as primeiras colônias fibroblásticas notáveis após 72 horas, enquanto para chegar ao mesmo estágio o outro meio levou 5 dias. No quinto dia do experimento o meio Knock-out atingiu um estágio de proliferação onde se observava alta concentração e grande densidade das CTM's, no segundo meio esse estágio começou a surgir após o décimo dia. No décimo dia de experimento a placa Knock-out DMEM obtinha CTM's em ocupação de toda área do meio de cultura, e o meio DMEM – alta concentração de glicose não atingiu o mesmo estágio, provando então que o desenvolvimento, multiplicação e proliferação das CTM's são muito mais eficientes em meio de cultura Knock-out DMEM, como demonstra a figura 2. A importância desse trabalho foi evidenciar e confirmar qual a forma mais hábil e competente para obtenção de colônias de CTM's para uso em transplantes, acelerando os tratamentos em pacientes que não poderiam esperar por muito tempo sem o transplante das CT's, assim, futuramente com mais pesquisas na área o uso terapêutico das CT's se tornariam uma forma eficaz e rápida de tratamentos de doenças em pacientes em estágios avançados de doenças.

[Digite texto]

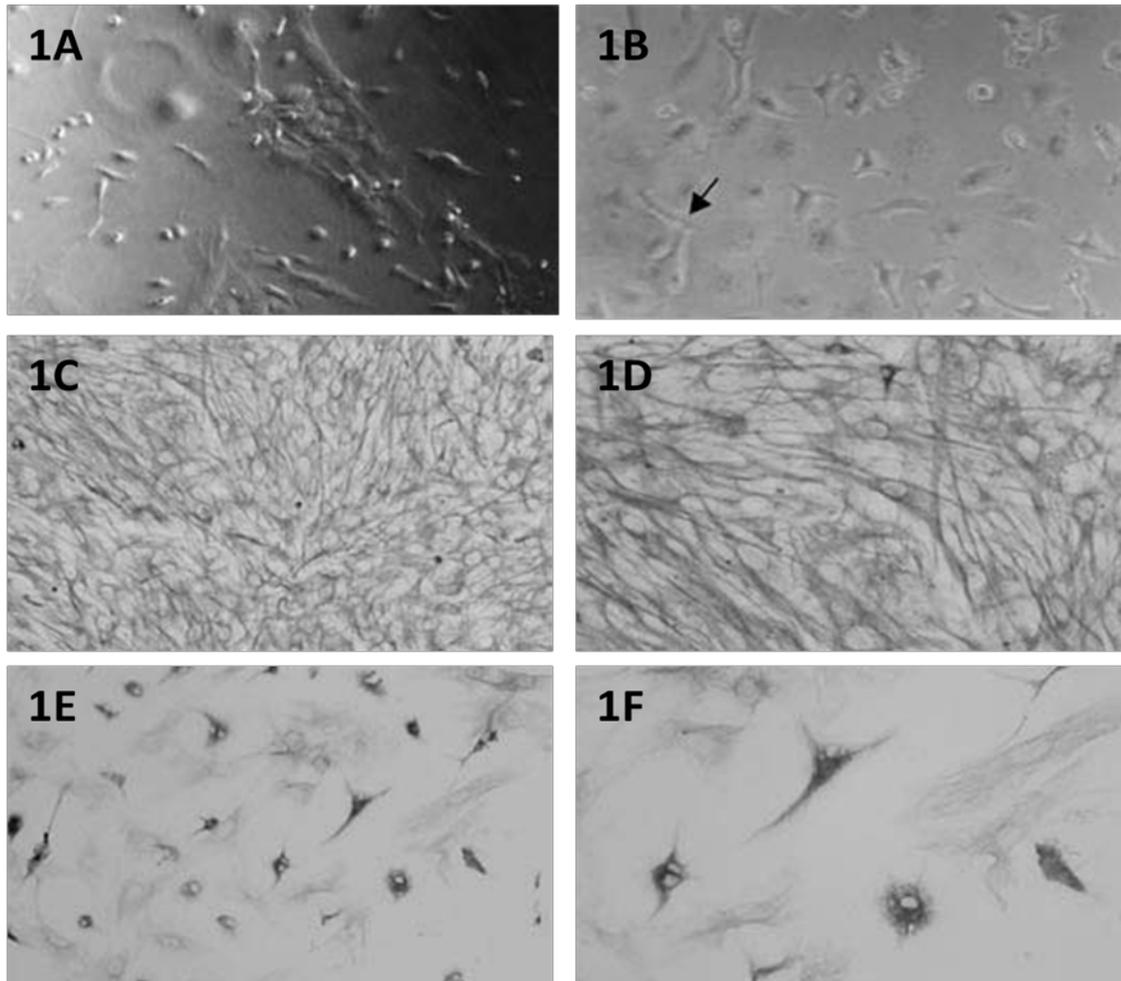


Figura 2: Microfotografia de contraste de fase das células mesenquimais em cultura (A-B). Presença de colônias de células com morfologia fibroblastóide em 5 dias de cultura com o meio Knockout DMEM (A) e no meio DMEM alta concentração de glicose, as células formaram colônias em 10 dias (B). Aumento: x400 respectivamente. Microfotografia de células tronco mesenquimais marcadas com anticorpo antivimentina (C-F). Observe a grande densidade celular com morfologia alongada cultivada no meio Knockout DMEM (C, D). A concentração celular foi menor com o meio DMEM alta concentração de glicose (E, F). Aumento: (C, E) x200 (D, F) x400. Fonte: Bittencourt et al., 2005.

Células-Tronco e Reparação Tecidual

Lesões teciduais em geral comprometem a funcionalidade do tecido acarretando perda de função e anatômica, gerando danos e em consequência ativam mecanismos de restauração do local lesado. Após o acometimento da lesão começa a reparação onde células do sistema imune (processo inflamatório) recrutam células da resposta imune inata, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, e células da resposta adquirida, os linfócitos. Esse processo ativa células que participam do processo reparativo após expressar moléculas estimulatórias e

[Digite texto]

mediadores inflamatórios. Concomitantemente ao processo mais células do sistema imune são quimioatraídas a partir do desequilíbrio homeostático, ativando células endoteliais que geram estímulos para recrutamento das CTM's. As CTM's se proliferam aumentando a secreção de moléculas bioativas, que atuarão diretamente na lesão ou por diapedese entram na corrente sanguínea para desempenharem efeitos parácrinos. Além de secretar as biomoléculas, as CTM's também expressam receptores para quimiocinas e fatores de crescimento, assim podem ser estimuladas por células periféricas. Estudos recentes sobre o comportamento imunológico das CTM's mostram avanços no uso terapêutico pela possibilidade de tratamento alógeno (MONTEIRO et al. 2009).

Jazedje e colaboradores (2009) elucidaram a dinamicidade das CTM's em diferenciar-se em diversos tipos de tecidos após cultura em DMEM/F-12. Foi observado no experimento que as CTM's possuem alta plasticidade e diferenciam-se por indução em diversos tipos de tecidos, entre eles músculos, ossos, tecido adiposo e cartilagem, apresentando-se íntegras e uniformes, onde não houve perda nem anomalias cromossômicas, a grande maioria expressou marcadores de adesão (CD29, CD44 e CD90) e CTM's marcadores (CD13, CD73, SH2, SH3 E SH4), além de não expressarem marcadores de linhagem hematopoiéticas (CD34, CD38, CD45, CD117 e CD133), nem marcador endotelial (CD31) e, marcador de monócitos (CD14).

Ainda segundo o autor, as culturas foram avaliadas após 40 dias e foi verificado, a partir de marcadores específicos, a diferenciação nas multilinhagens almejadas, após indução do mesoderma, se diferenciando em células miogênicas, adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas. Esse estudo comprovou e confirmou a multipotencialidade das CTM's (Figura 3).

[Digite texto]

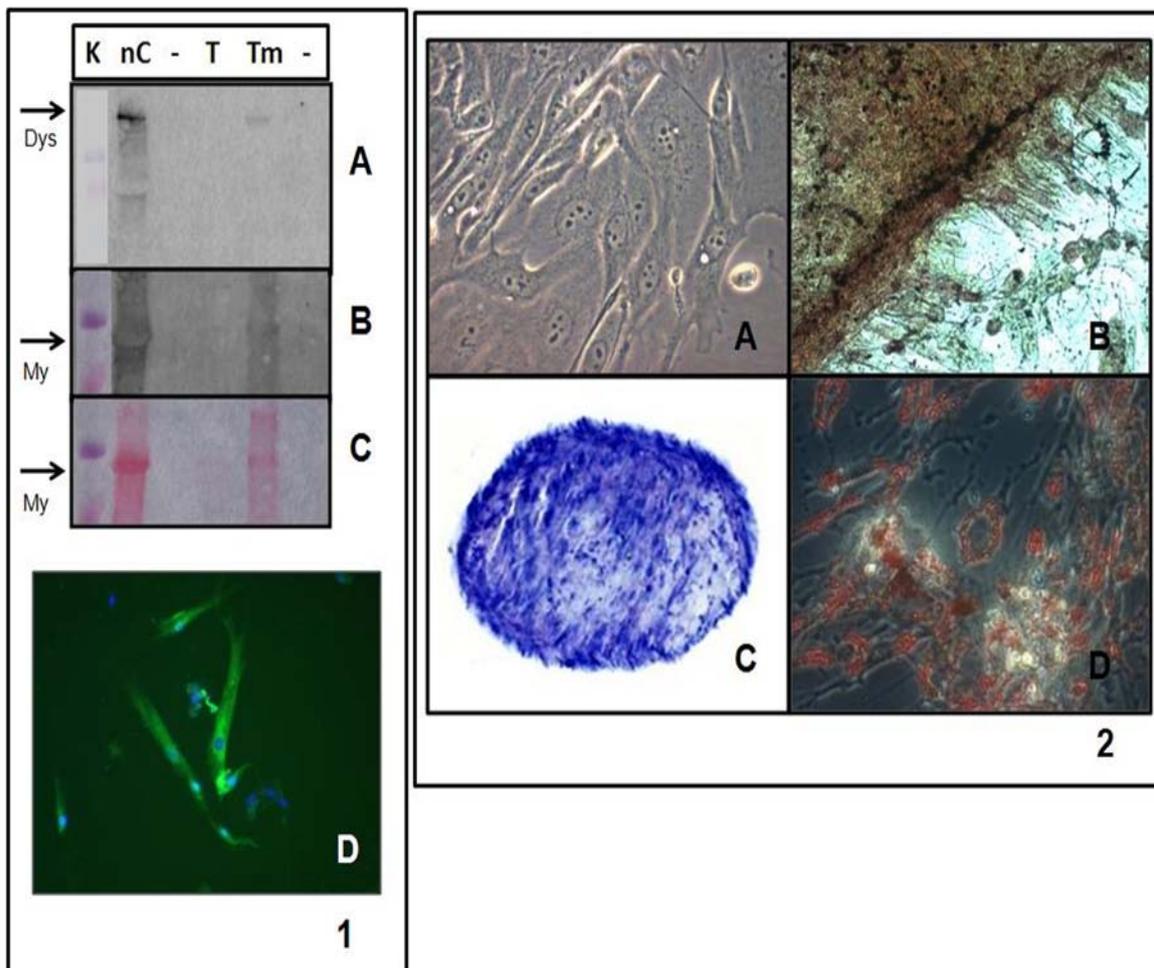


Figura 3: Diferenciação multilinhagem *in vitro* 1) Diferenciação miogênica. K representa caleidoscópio (BioRad marcador molecular) nC representa controle normal do músculo esquelético humano, T representa controle httMSCs, Tm representa células hFTs induzidas por diferenciação miogênica. 1^a) Expressão distrofina no controle muscular e nas células hFTs induzidas. 1B) Miosina esquelética expressa em controle muscular e células hFTs induzidas. 1C) Faixa de miosina observada no controle muscular e células hFTs induzidas por Ponceu S tingimento da membrana. 1D) Ensaio IF, indicando expressão de distrofina (em verde fluorescente) em diferenciação de miotubos a partir de células hFTs, onde os núcleos foram coloridos com DAPI (azul fluorescente) (400x) 2)Osteogênico, condrogênico e adipogênicas diferenciações de células hFTs . 2^a)Controle de células hFTs (630x). 2B) diferenciação osteogênica (200x). 2c) diferenciação condrogênica (100x) 2D) Diferenciação adipogênica (630x) (Microscópio Zeiss Axiovert 200)

Fonte: Jazedje et al., 2009.

Tratamentos com Células-Tronco Mesenquimais

Fundamentado no conceito de que as CT's são células indiferenciadas e que podem se transformar em qualquer célula de qualquer tecido (sob certos estímulos específicos e fatores de crescimento) se renovando e reproduzindo indefinidamente, as pesquisas nessa área vêm aumentando para tratamentos de transplantes recompondo perdas e avarias teciduais, possibilitando seu uso terapêutico na medicina regenerativa (ARAÚJO et al. 2005).

[Digite texto]

Caliári (2010) descreveu o potencial terapêutico das CTM's em feridas ocasionadas por queimaduras em ratos. É sabido que pacientes acometidos por graves e extensas queimaduras necessitam de grande tempo de internação e dependendo da seriedade podem ir a óbito em poucos dias. Assim a alternativa de terapia com transplante de CTM's é uma opção para acelerar o processo de cicatrização. Vale destacar que as CTM's têm propriedades de angiogênese, regeneração e imunoregulação o que torna seu emprego favorável e prometem bons resultados. Neste trabalho as CTM's foram retiradas da medula óssea de camundongos e proliferadas *in vitro*. Os ratos de laboratório (Wistar) foram submetidos a queimaduras através de contato por 25 segundos em chapa de metal aquecida a 200°C, onde foi acometido o dorso tricotomizado. O procedimento originou extensas e graves queimaduras

Segundo o autor a etapa seguinte foi aplicação de CTM's por via intradérmica (ID) no grupo tratado (CTM-ID) e aplicação de PBS (tampão fosfato tamponado) via ID no grupo controle (PBS-ID). A taxa de mortalidade pós-queimadura foi comparada entre os dois grupos, havendo diminuição de óbito no grupo CTM-ID (23,81%) em relação aos PSB-ID (39,14%). Além disso, foi observada melhora do processo de cicatrização após o 45º dia no grupo CTM-ID em relação ao grupo PBS-ID. Durante todo procedimento foi analisado os fatores imunológicos, como alterações das populações TCD4+ e TCD8+ advindas do baço, para tanto houve sacrifício de alguns animais no 7º dia de experimento, não evidenciando diferenças entre os grupos, e da região das queimaduras, onde foi observada a presença dos linfócitos em quantidades esperadas sem grandes diferenças entre os grupos, porém apresentando-se sempre em uma leve concentração maior no grupo PBS-IS em relação ao grupo CTM-ID, nas próximas avaliações manteve-se a relação estatística de praticamente mesma concentração dos linfócitos nos dois grupos. Também foi analisada a concentração de neutrófilos da região lesionada.

Ao final do experimento, no 60º dia, houve a última avaliação do processo de cicatrização, observando-se notável diferença entre os grupos, em que o grupo CTM-ID apresentou melhor cicatrização em relação ao grupo PBS-ID, comprovando que a utilização terapêutica das CTM's neste caso se superou no rápido revestimento das lesões acometidas por queimaduras (Figura 4, 5 e 6). Assim o trabalho publicado teve o objetivo de demonstrar que a terapia regenerativa com CTM's para pacientes não só acometidos por queimaduras, mas também por outras

[Digite texto]

doenças de pele, tem resultados promissores, podendo embasar tratamentos e outras pesquisas na área a fim de acelerar ainda mais o procedimento de regeneração tecidual para pacientes que tenham pressa no tratamento (CALIÁRI, 2010).

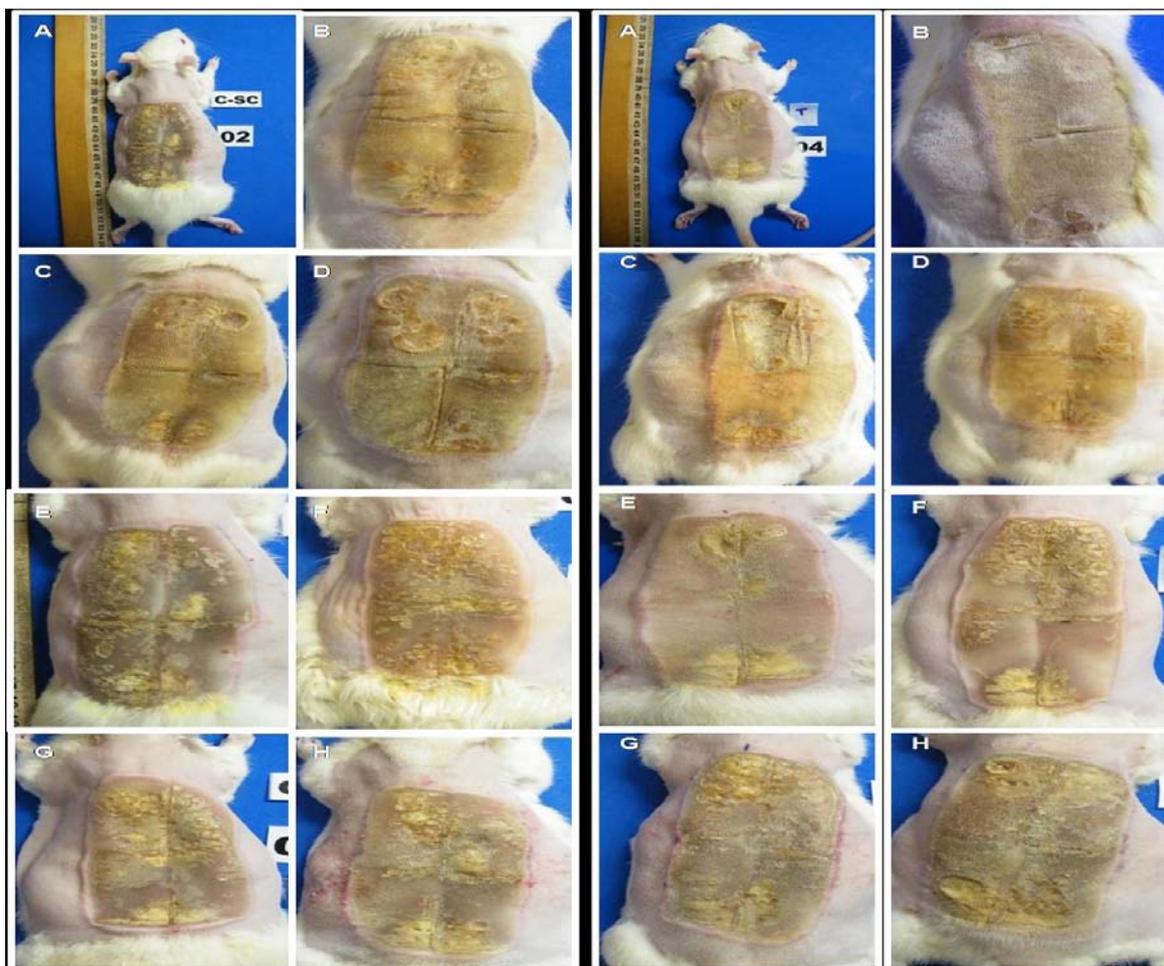


Figura 4: Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura nos animais. À esquerda o subgrupo PBS-ID no início do experimento (0d). A. Aspecto geral de um animal pertencente ao subgrupo PBS-ID no 0d após a realização da queimadura experimental. **B-H.** Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura no dorso dos animais pertencentes ao subgrupo PBS-ID no 0d após a realização da queimadura experimental. **À direita o subgrupo CTM-ID no início do experimento (0d). A.** Aspecto geral de um animal pertencente ao subgrupo CTM-ID no 0d após a realização da queimadura experimental. **B-H.** Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura no dorso dos animais pertencentes ao subgrupo CTM-ID no 0d após a realização da queimadura experimental. Fonte: Caliári, 2010, com alterações.

[Digite texto]

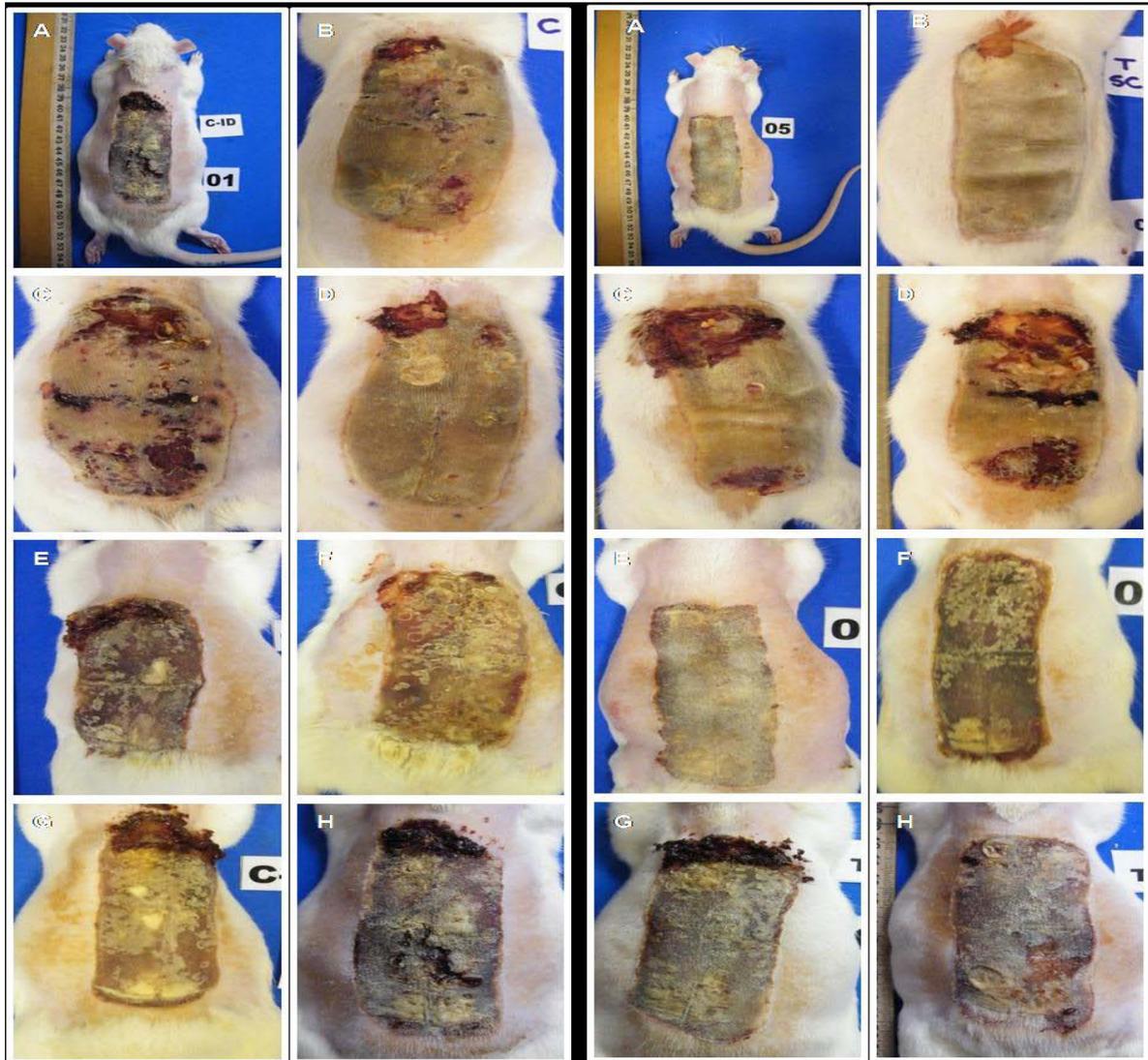


Figura 5: Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura nos animais no sétimo dia após o início do experimento. À esquerda o subgrupo PBS-ID (7d). A. Aspecto geral de um animal pertencente ao subgrupo PBS-ID no 7d após a realização da queimadura experimental. **B-H.** Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura no dorso dos animais pertencentes ao subgrupo PBS-ID no 7d após a realização da queimadura experimental. À direita o **subgrupo CTM-ID no sétimo dia do início do experimento (7d). A.** Aspecto geral de um animal pertencente ao subgrupo CTM-ID no 7d após a realização da queimadura experimental. **B-H.** Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura no dorso dos animais pertencentes ao subgrupo CTM-ID no 7d após a realização da queimadura experimental.

Fonte: Caliári, 2010, com alterações.

[Digite texto]

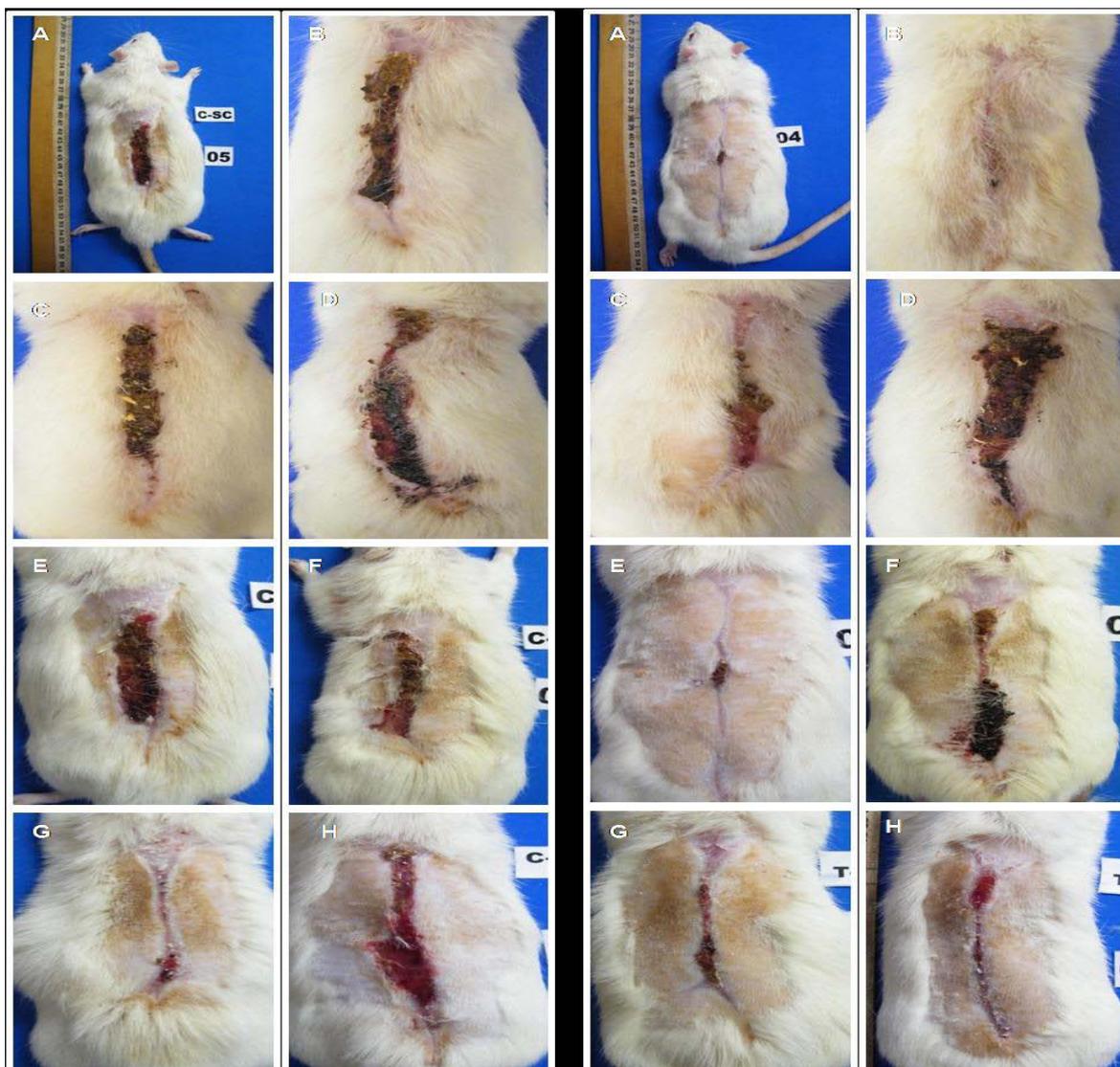


Figura 6: Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura nos animais. À esquerda o subgrupo PBS-ID no sexagésimo dia após o início do experimento (60d). A. Aspecto geral de um animal pertencente ao subgrupo PBS-ID no 60d após a realização da queimadura experimental. **B-H.** Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura no dorso dos animais pertencentes ao subgrupo PBS-ID no 60d após a realização da queimadura experimental. **À direita o subgrupo CTM-ID no sexagésimo dia após o início do experimento (60d). A.** Aspecto geral de um animal pertencente ao subgrupo CTM-ID no 60d após a realização da queimadura experimental. **B-H.** Aspecto das feridas ocasionadas por queimadura no dorso dos animais pertencentes ao subgrupo CTM-ID no 60d após a realização da queimadura experimental.

Fonte: Caliári, 2010, com alterações.

Reder e colaboradores (2009) publicaram trabalho corroborando a eficácia do uso terapêutico das CTM's, seja ela propriamente dita, ou sua forma lisada, onde ao concluir a pesquisa houve resposta positiva nos dois casos. O objetivo foi verificar a influência das CTM's e CTM's lisadas em xenotransplante na organização neural no hipocampo de ratos com epilepsia induzida pelo modelo da

[Digite texto]

lítio-pilocarpina. Foram utilizados do experimento ratos Wistar com 30 dias de vida, e divididos em 5 grupos, já as CTM's foram obtidas de camundongos machos. Os pesquisadores injetaram no grupo I (Grupo Pilo) cloreto de lítio (127mg/kg) e 14 horas após foi administrado metilescopolamina e hidrocloreto de pilocarpina (60mg/kg) para indução de *status epilepticus*, que foi mantido por 90 min. e amenizado com diazepam (10mg/kg). No grupo II (Grupo Pilo+CTM's) o tratamento foi o mesmo do Grupo Pilo, porém após 21 dias houve o transplante de CTM's. O grupo III (Grupo Salina) recebeu apenas solução salina. O grupo IV (Grupo Salina+CTM's) em substituição a Pilo receberam solução salina e após 21 dias houve o transplante de CTM's. O grupo V (Grupo Pilo+Lise) receberam mesmo tratamento do Grupo Pilo, porém o transplante foi de CTM's lisadas.

Ainda segundo os autores, após 13 dias do tratamento para indução de *status epilepticus*, os animais do grupo Pilo (grupos I, II e V) foram observados através de filmagens em estágio pré-transplante e pós-transplante, sendo por 6h no período claro e 6h no período escuro, e por 14 dias, respectivamente, a fim de monitorar as crises espontâneas recorrentes. Em seguida, após o 60º dia do transplante os animais foram submetidos a teste comportamentais e cognitivos como reconhecimento de objetos, labirinto aquático de Morris, esQUIVA inibitória, entre outros. Ao final dos testes os resultados obtidos foram satisfatórios para os Grupos Pilo (Pilo, Pilo+CTM's e Pilo+Lise) onde em período pré e pós transplante observaram que para os grupos I e II não houve alteração significativa entre os períodos. Mas, quando analisamos os períodos do grupo V, verificaram que a frequência das crises espontâneas recorrentes foi significativamente menor no período pós transplante, determinando que apenas o transplante de CTM's não promoveu uma diminuição na frequência das crises. Concluíram então que o transplante de CTM's lisadas foi mais eficiente no controle de crises do que as CTM's, verificando que o potencial dessas células de alguma forma influencia na reorganização neural das áreas do cérebro lesionadas pela epilepsia que foi induzida.

Pelo fato desse resultado não ter sido obtido nos animais do grupo I e II, onde o transplante foi de CTM's íntegras, concluíram que o conteúdo citoplasmático é mais eficaz para esse tipo de terapia. De uma forma geral os resultados obtidos com os transplantes de CTM's e CTM's lisadas foram satisfatórios, demonstrando que podem reverter parcialmente o déficit cognitivo gerado pela epilepsia. Os

[Digite texto]

pesquisadores pretendem continuar as pesquisas para aprofundar o conhecimento sobre o potencial reparativo, seus fatores tróficos e sua influência nas lesões hipocâmpais (REDER et al., 2009).

Fu e colaboradores (2008) em pesquisa ocorrida na China, feita para reverter efeitos colaterais causados por drogas quimioterápicas em tratamentos de neoplasias conseguiram resultados positivos na regeneração do tecido ovariano. Esses medicamentos causam danos aos ovários, que leva a esterilidade feminina. Os autores pesquisaram a ação das CTM's em ovários de ratos, primeiramente esses foram tratados com ciclofosfamida, e depois transplantados com CTM's que foram isoladas de ratos isogênicos e expandidas *in vitro* e transplantadas posteriormente bilateralmente. Houve melhora da função e estrutura dos ovários lesionados pela quimioterapia.

O experimento foi conduzido a partir da avaliação de ciclo e níveis hormonais da função ovariana após 2, 4, 6 e 8 semanas, o resultado para o tratamento de CTM's no local foi melhora na função ovariana e aumento da expressão de Bcl-2 como consequência da diminuição de apoptose das células granulosas do ovário. A conclusão da pesquisa mais uma vez demonstra a plasticidade na diferenciação e regeneração tecidual direta ou indiretamente das CTM's, uma vez que os pesquisadores não souberam descrever se houve realmente diferenciação direta em células do tecido alvo (ovário) ou se foi resultado da ação indireta das CTM's através de fatores parácrinos. Ainda assim o resultado foi muito promissor, uma vez que possibilitou de alguma forma a regeneração da área afetada, contribuindo para que haja mais pesquisas na área e aprimorando a técnica (FU et al., 2008).

Há muitos estudos na área na terapia de CT's (mesenquimais e outras linhagens) para regeneração de tecido muscular cardíaco, um artigo publicado por Guarita-Souza e col. (2005) comparou o resultado de sua pesquisa a diversos outros trabalhos publicados na literatura sobre o assunto. Em seu estudo analisaram o efeito do transplante de CTM's e CT's mononucleadas em ratos Wistar induzidos ao infarto do miocárdio após anestesia com medicamentos (50mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xylazina, ambas por via intraperitoneal.) e posterior submissão a toracotomia lateral esquerda para conectar a artéria coronária esquerda com o fio polipropileno 7.0 causando o infarto da parede ântero-lateral do ventrículo esquerdo. Após sete dias do procedimento ocorrido, houve nova sedação dos animais e

[Digite texto]

avaliação ecocardiográfica transtorácica, para medições, exclusão, classificações e agrupamentos dos animais. Os animais foram divididos em três grupos: I- controle, II- mononuclear e III- mesenquimal.

Conforme os autores o transplante celular ocorreu após 8 dias da indução do infarto do miocárdio, após serem anestesiados com o mesmo medicamento já citado, e submetidos a esternotomia mediana transesternal e dissecação das aderências. O grupo I recebeu 0,15mL de meio de cultura na região do infarto, o grupo II recebeu 3×10^6 de células mononucleadas e o grupo III recebeu 3×10^6 de células mesenquimais. Devido ao transplante ser heterólogo, todos os animais receberam ciclosporina 15mg/Kg/peso/dia após a injeção das células. Após 30 dias do transplante os animais foram submetidos a análise funcional e após foram sacrificados por supradosagem de anestésicos celular, os corações removidos, lavados com PBS e criopreservados em nitrogênio líquido. Houve análise histológica dos grupos resultando que o grupo I identificou grande quantidade de fibrose sem aparecimento de nenhum outro tipo de tecido formado, o grupo II identificou a presença de neovasos e células endoteliais na região de fibroses, enquanto que o grupo III além de apresentar neovasos e células endoteliais também apresentaram células musculares lisas (figura 7).

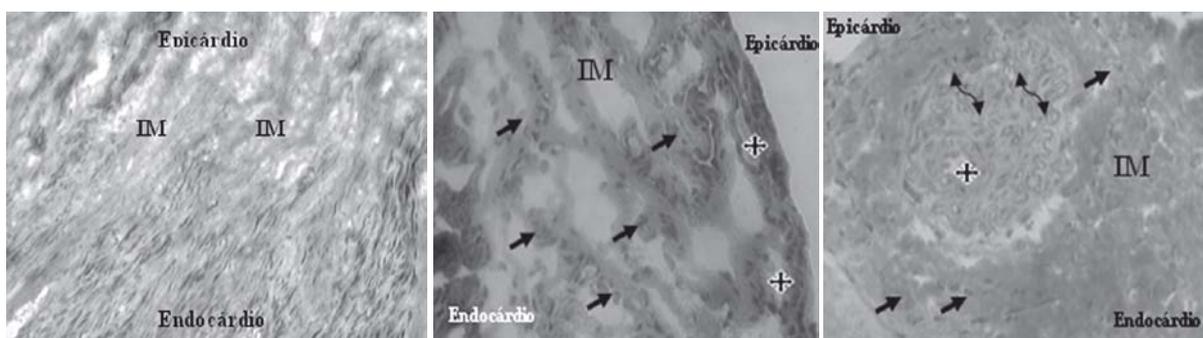


Figura 7: Respectivamente, da esquerda para a direita: Grupo I - Infarto do miocárdio (IM) - Tricrômio de Gomery, x400; Grupo II - Células endoteliais (flechas) e neovasos (estrelas) identificadas após o transplante de células mononucleares no infarto do miocárdio (IM) - Tricrômio de Gomery, x200; Grupo III - Neovaso formado (estrela), células endoteliais (flechas) e células musculares lisas (flechas duplas), após o transplante de células mesenquimais no infarto do miocárdio (IM) - Tricrômio de Gomery, x400.

Fonte: Guarita – Souza et al., 2005.

Em comparação a outros estudos os autores ainda diferenciam sua pesquisa das outras pelo fato de que o modelo utilizado por eles foi o de infarto

[Digite texto]

crônico com fibrose já estabelecida, diferentemente dos outros estudos, portanto seus resultados na pesquisa seriam diferentes, tendo em vista que os tratamentos são diferentes. A conclusão obtida a partir dos resultados foi de que a parte funcional dos transplantados por CT's mononucleadas e CTM's foram sobreponíveis nos parâmetros avaliados. Já em relação à anatomia patológica, a evidência de neoangiogêneses torna-se a principal característica da utilização das CT's neste caso, com resultados mais favoráveis para os transplantados de CTM's, que também apresentaram células musculares lisas. Entretanto essa descoberta só é útil para opção de tratamentos de miocárdios hibernados, sem condição técnica de cirurgia reparativa e resistentes a tratamentos medicamentosos. Contudo, não houve efeito remodelador ventricular, apenas melhora no aspecto histológico e regeneração vascular (GUARITA-SOUZA et al., 2005).

Conclusão

A ciência busca através de pesquisas e experimentos alcançar avanços em tratamentos úteis e velozes para sanar tais avarias. Ao mesmo tempo em que muita coisa já foi descoberta observamos que falta aplicar na prática em seres humanos. As CTM são raras e têm potencial para se diferenciar em tecidos mesenquimais e não mesenquimais, mostrando-se muito potente em diferenciação e potencialidade. Há o isolamento de CT de locais antes não encontrados. No futuro com as técnicas desenvolvidas e aprimoradas, espera-se que as doenças sejam menos mitificadas e os tratamentos mais precisos para que não haja tantas mortes por doenças que no futuro serão banais e hoje são consideradas tabus. Mesmo com todos os avanços as terapias de regeneração tecidual ainda estão em fase experimental, necessitando de muito mais estudos para se firmar como tratamento. Já se sabe o potencial das CTM, basta agora destrinchar toda sua eficácia e potencialidade para num futuro próximo poder utilizá-las em tratamentos.

[Digite texto]

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, J. D.; ARAÚJO FILHO, J. D.; CIORLIN, E.; RUIZ, M. A.; RUIZ, L. P.; GRECO, O. T.; LAGO, M. R.; ARDITO, **Terapia celular no tratamento da isquemia dos Membros inferiores**. R. V. J, Vasc Br, Vol. 4, Nº4, 2005.

BIENFAIT, M. **Os desequilíbrios estáticos: filosofia, patologia e tratamento fisioterápico** / Marcel Bienfait ; [tradução Angela Santos]. – São Paulo: Summus, 1995. ISBN 85-323-0453-2.

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

CALIÁRI, C. O. **Avaliação do potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais em feridas ocasionadas por queimaduras em ratos**. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2010.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A Célula, uma abordagem molecular**. 3ª Ed. Editora Artmed, 2007, ISBN 978-85-363-0883-8.

CORDEIRO, J. M. C., **Exame neurológico de pequenos animais**, Pelotas: EDUCAT, p. 547 – 568, 1996.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M. **Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual**. Ciênc. vet. tróp., Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.167-169, abril, 2008.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M. **Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações**. Revista Ceres, 56(4): 446-450, 2009, ISSN 0034-737X.

FU, X.; HE, Y.; Xie, C.; LIU, W. **Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage**. Cytotherapy, 10:353-63, 2008.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GUARITA-SOUZA, L. C., CARVALHO, K. A. T., REBELATTO, C., SENEGAGLIA, A., HANSEN, P., FURUTA, M., MIYAGUE, N., FRANCISCO, J. C., OLANDOSKI, M., WOITOWICZ, V., SIMEONI, R., FARIA-NETO, J. R., BROFMAN, P. **A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio**. Braz J Cardiovasc Surg 2005; 20(3): 270-278.

[Digite texto]

HOCHEDLINGER, K.; JAENISH, R. **Nuclear Transplantation, Embryonic Stem Cells and the Potential for Cell Therapy**. N. Engl. Journal of Medicine, 349:275-212, 2003.

JAZEDJE, T.; PERIN, P. M.; CZERESNIA, C.; E., MALUF, M.; HALPERN, S.; SECCO, M.; BUENO, D. F.; VIEIRA, N. M.; ZUCCONI, E.; ZATZ M. **Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures**. Journal of Translational Medicine, 7:46, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8ª Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. ISBN 978-85-277-1045-9.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. ISBN 978-85-277-1402-0.

KIRSCHSTEIN, R. **Stem cells: scientific progress and future research**. Bethesda: The Nacional Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. Prefácio Gilberto belisário Campos 2ª Ed. – São Paulo: Editora Ateneu, 2000.

MACIEL, B. B. **Isolamento, cultivo e caracterização de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, 2010.

MONTAGNER, D.; CORRÊA, G. M. **Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs**. Rev. Bras. Farm., 85(3): 69-72, 2004.

MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. **Células-tronco mesenquimais**. Ciência Rural, Santa Maria, 2009, ISSN 0103-8478.

OLIVEIRA, M. D. C.; SOUZA, L. B.; PINTO, L. P.; FREITAS, R. A. **Estudo imuno-histoquímico de componentes da membrana basal em cistos odontogênicos**. *Pesqui. Odontol. Bras.* [online]. vol.16, n.2, pp. 157-162, 2002. ISSN 1517-7491.

REDER, G. M., CAGOL, T. C., MACHADO, D. C., COSTA, J. C. **Efeito do transplante de células tronco mesenquimais e de células lisadas da medula óssea em ratos submetidos ao modelo lítio-pilocarpina**. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009.

SCHWINDT, T. T., BARNABÉ, G. F., LEAM, M. **Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco**. J Bras Neurocirurg 16(1), 13-19, 2005.

[Digite texto]

SILVA, C. P.; BENTO; E. S.; SOUZA, L. A. P. **Uma abordagem biotecnológica, bioética da utilização de células-tronco embrionárias no Brasil.** Conexão – Publicação Científica Multidisciplinar da AEMS, ano 7, nº1, Janeiro – Dezembro de 2010, ISSN 1807-1414.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NIBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral.** Tradução da 6ª Ed. rev. e aum. Norte americana. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 2003.

TIMM, L. L. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas.** Caderno La Salle XI, Canoas, v.2, nº 1, p. 231– 239, 2005.

WEXLER, S. A., DONALDSON, C., DENNING-KENDALL, P., RICE, C., BRADLEY, B., HOWS, J. M. **Adult bone marrow is a rich source os human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are note.** Br. J. Haematol, 121:368-374, 2003.

YAMANAKA, S. **Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells.** Cell Stem Cell. v. 1; p. 39–49, 2007.