



ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO DE RECÉM-NASCIDOS A TERMO OU PREMATUROS

Matteus Teixeira Guerra¹
Valéria Pinhatti²
Paulo Nader³
Nance Beyer Nardi⁴

Resumo

Apesar de raras no sangue do cordão umbilical, as células-tronco/estromais mesenquimais (MSCs) são abundantes na parede do cordão. Considerando-se o grande potencial de utilização terapêutica de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical (MSCs-Co) em vários tipos de situação, torna-se também de alta importância a caracterização dessas células em recém-nascidos prematuros, de mães normais ou em situações como a pré-eclâmpsia, patologia ainda pouco compreendida e responsável por mais de 7% de mortalidade materno-fetal. Este trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar MSCs-Co de recém-nascidos a termo, e prematuros nascidos de mães normais ou com pré-eclâmpsia, comparando morfologia, imunofenótipo e capacidade de diferenciação e imunossupressão nestas populações. As células são isoladas com colagenase e cultivadas conforme previamente estabelecido em nosso laboratório. Os resultados preliminares obtidos até o momento indicam morfologia, imunofenótipo e capacidade de diferenciação normais para MSCs, mas o número de amostras analisadas ainda não permite concluir sobre possíveis diferenças entre os recém-nascidos normais e prematuros.

Palavras chave: células-tronco mesenquimais; cordão umbilical; pré-eclâmpsia.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco adultas, de origem mesodérmica primordial, e de grande plasticidade (revisado por Nardi e da Silva Meirelles, 2006). Suas principais propriedades são: (i) autorrenovação e diferenciação multipotente; (ii) habilidade quimiotática e migração aos locais de dano e inflamação; (iii) secreção de mediadores parácrinos e fatores tróficos; (iv) propriedades imunomodulatórias; (v) propriedades angiogênicas e (vi) papel nas reações inflamatórias. As MSCs estão presentes em todo o organismo (da Silva Meirelles et al., 2006), e seu potencial terapêutico é principalmente explicado pela produção de moléculas bioativas e capacidade de resposta a este tipo biomolécula (Meirelles e Nardi, 2009). Essas biomoléculas e as MSCs fornecem um microsistema regenerativo em lesões, são capazes de limitar a área lesada e montar uma autorresposta regenerativa através de seus mediadores regenerativos, em ação local.

As células-tronco mesenquimais da parede do cordão umbilical (MSC-Co) são mais primitivas que as MSCs de outros tecidos (Wang et al., 2004). Alguns estudos têm descrito as características imunológicas das MSC-Co. Elas apresentam maior produção de citocinas

¹ Aluno do curso de graduação em Biomedicina – Bolsista PIBIT/CNPq – matteus.guerra@hotmail.com

² Técnica de laboratório do PPGBioSaúde - valpinhatti@hotmail.com

³ Aluno de doutorado no PPGBioSaúde - pj.nader@gmail.com

⁴ Professora do PPGBioSaúde – nance.nardi@ulbra.br

tolerogênicas como TGF- β e IL-10, e menor expressão de moléculas do MHC classe I que as MSCs da medula óssea, e ausência de classe II (Weiss et al., 2008). Liu et al. (2012) observaram a expressão de inibidores do sistema imune como HLA-G, IDO e PGE2, bem como uma baixa imunogenicidade e alto potencial de indução de imunotolerância por estas células.

A prematuridade, definida como idade gestacional inferior a 37 semanas, é responsável por mais de 50% da mortalidade infantil e de paráliticos cerebrais (SLATTERY; MORRISON, 2002). A pré-eclâmpsia é um quadro que restringe o crescimento e nutrição fetal, por redução de fluxo placentário ao feto, sendo responsável por mais de 7% de mortalidade materno-fetal. A etiologia e patogênese da pré-eclâmpsia envolvem uma combinação de fatores de predisposição materno-fetal e fatores ambientais (ROBERTS et al., 1989).

Considerando-se o grande potencial de utilização terapêutica de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical em vários tipos de situação, torna-se também de alta importância a caracterização dessas células em recém-nascidos prematuros, de mães normais ou em situações como a pré-eclâmpsia. Entretanto, estes estudos são praticamente inexistentes.

Este projeto tem como objetivo caracterizar a população de MSC-Co em recém-nascidos prematuros, adequados para a idade gestacional, de mães saudáveis ou com pré-eclâmpsia e compará-las com MSC-Co de recém-nascidos a termo saudáveis.

METODOLOGIA

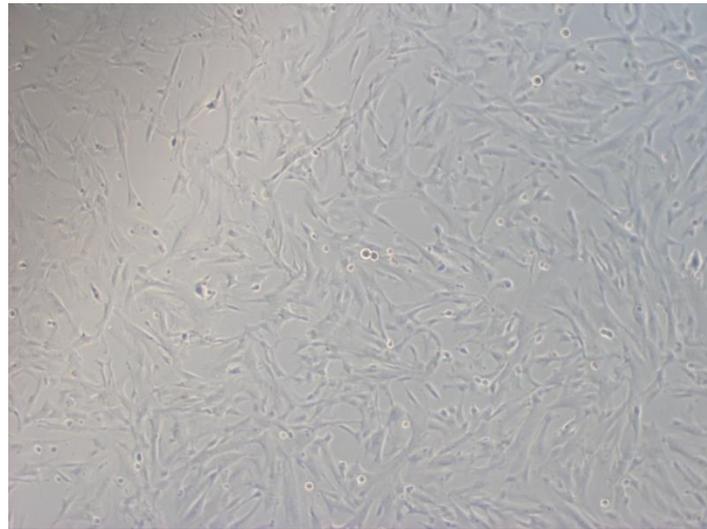
O cordão umbilical é coletado após o nascimento, havendo assinatura do termo de consentimento informado pelas mães. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da ULBRA (processo nº 1.697.263).

As células tronco são isoladas a partir da veia do cordão umbilical, com o uso de colagenase tipo I diluída em 5 ml de HDMEM + 20% SFB, por cerca de 45 min a 37 °C. A morfologia das culturas é analisada por exame periódico em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemanha). Fotomicrografias são feitas com câmera digital (AxioCamMRC, Carl Zeiss), usando o programa ZEN (Carl Zeiss). As células utilizadas nos experimentos são mantidas em cultura, expandidas e caracterizadas entre as passagens 3 a 5. A análise do fenótipo de superfície é realizada por incubação das células com anticorpos conjugados a fluorocromo e leitura em citômetro de fluxo BD Accuri C6 Plus. A capacidade de diferenciação celular é determinada por cultivo com meio indutor de diferenciação adipogênica e osteogênica (da Silva Meirelles et al., 2006). Culturas controle serão mantidas com meio padrão durante o período da diferenciação. Para a observação da diferenciação, após o período de indução as culturas serão coradas com corantes específicos (Oil Red O e Alizarin Red S, respectivamente).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

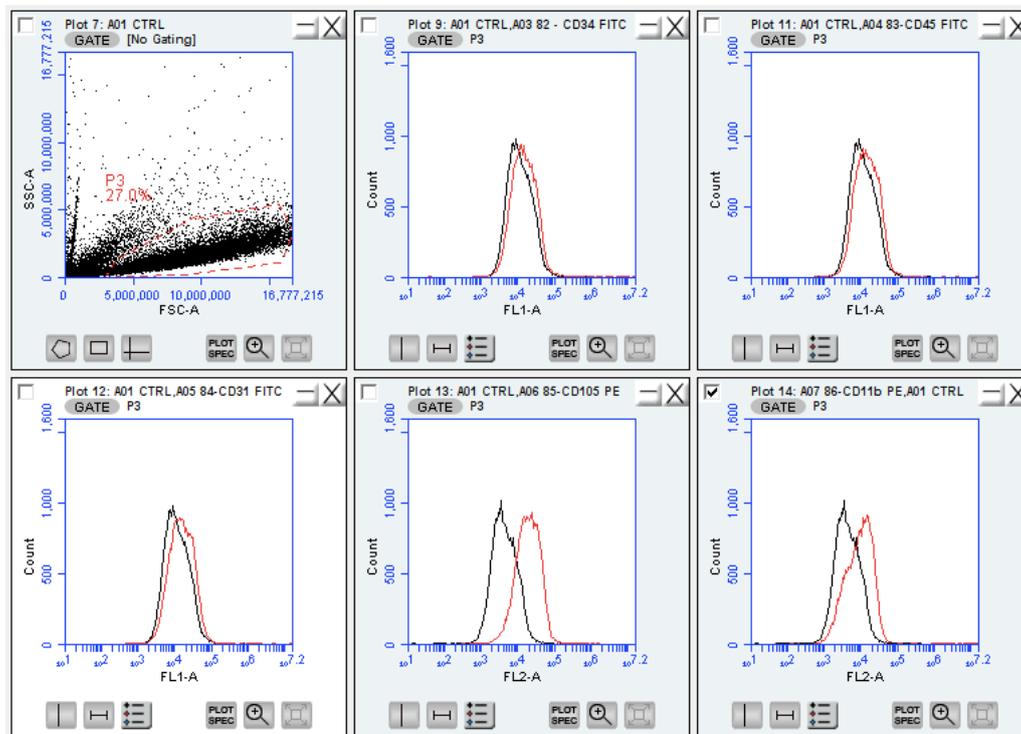
Até o momento, os métodos para isolamento e cultivo das MSC-Co foram estabelecidos com sucesso. As culturas apresentam uma morfologia fibroblastóide (Figura 1), que é característica deste tipo de células (MEIRELLES; NARDI, 2009).

Figura 1 - Cultivo de MSC-Co de recém-nascido normal, em P2, com morfologia fibroblastóide característica deste tipo celular. Contraste de fase, aumento 100x.



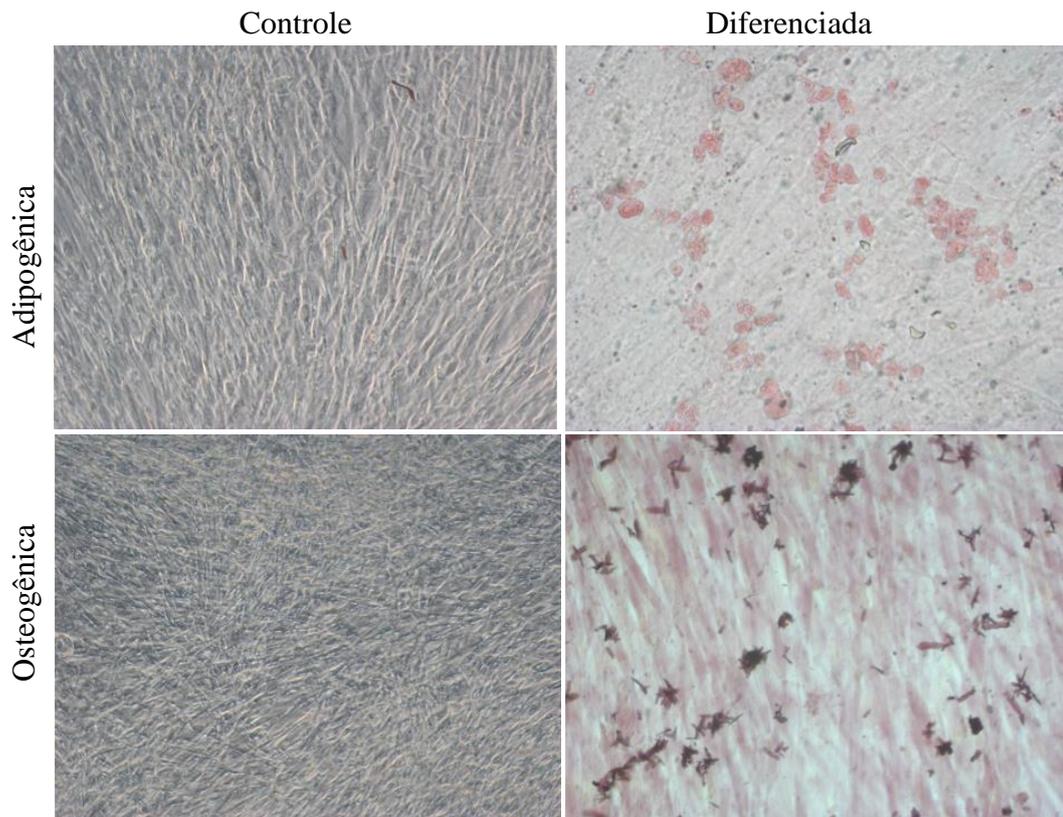
A análise do fenótipo de superfície das células (Figura 2) mostrou que elas são negativas para marcadores hematopoiéticos (CD11b, CD34 e CD45) e endotelial (CD31), sendo entretanto positivas para CD105. Estes resultados são compatíveis com as características determinadas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006).

Figura 2 - Imunofenótipo de MSC-Co de recém-nascido normal, em P2.



Do mesmo modo, as culturas foram capazes de diferenciar nas vias adipogênica e osteogênica (Figura 3), comprovando sua identidade como células-tronco/estromais (MEIRELLES; NARDI, 2009).

Figura 3 - Diferenciação adipogênica e osteogênica de MSC-Co de recém-nascido normal. Culturas controle foram mantidas em meio convencional, enquanto culturas diferenciadas foram mantidas em meio indutor das duas vias de diferenciação.



CONCLUSÕES

As amostras de cordão umbilical obtidas até o momento permitiram o estabelecimento dos métodos de isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais de cordão, com caracterizações que confirmam sua identidade. O aumento do número de amostras neste estudo permitirá a comparação das MSC-Co normais e de prematuros de mães com ou sem pré-eclâmpsia, com identificação de possíveis diferenças nesta população celular.

REFERÊNCIAS

DA SILVA MEIRELLES, L; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

LIU, S. et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. **Cellular Immunology**, v. 278, p. 35-44, 2012.

MEIRELLES, L. DA S.; NARDI, NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 4281-4298, 2009.

NARDI, N.B.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook in Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.

ROBERTS, J.M. et al. PreeclAmpsia: an endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 161, p. 1200-1204, 1989.

SLATTERY, M.M.; MORRISON, J.J. Preterm delivery. **Lancet**, v. 360, p. 1489–1497, 2002.

WANG, H.S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, p. 1330–1337, 2004.

WEISS, M,L, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 2865-2874, 2008.