

EFEITO DA INJEÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE MEDULA ÓSSEA NO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR



Patrícia Bencke Grudzinski^{1*}, Ana Paula Horn², Rudimar Luiz Frozza¹, Elisa Nicoloso¹, Nance Beyer Nardi³ e Christianne Salbego¹

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

² Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, FURG, Avenida Itália, Km 8, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

³ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9500, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

A terapia celular mostra-se uma alternativa promissora na cura de doenças neurodegenerativas. Contudo, estudos recentes sugerem possíveis efeitos adversos do uso dessas células em modelos animais. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que o meio condicionado de células tronco mesenquimais de medula óssea (CTMs) induz morte celular em cultura organotípica de fatias de hipocampo de ratos e agrava a lesão induzida por privação de oxigênio e glicose (Horn et al., 2009, Neurosci. Res. 63:35-41).

Além disso, utilizando modelo *in vivo*, observamos que a injeção intra-hipocampal de células tronco isoladas de medula óssea causam aumento no imunoconteúdo de GFAP (uma proteína de citoesqueleto de astrócitos) após três dias de recuperação, indicando uma ativação glial tanto no hipocampo ipsilateral como no contralateral à injeção das células (figura 1).

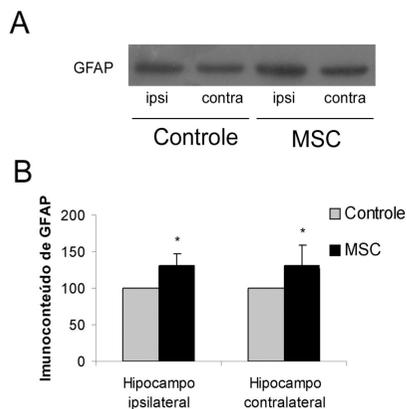


Figura 1: Imunocintidade de GFAP 3 dias após a administração de CTM em hipocampus de ratos Wistar. (A) Imagem representativa do imunocintidade de GFAP nos grupos controle e CTM. (B) Gráfico do imunocintidade de GFAP apresentado como percentual em relação aos controles (n=6, média±DP, ANOVA seguida de Tukey, p<0,05).

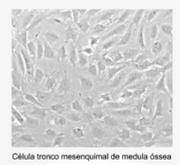
OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da injeção intra-hipocampal das células tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de medula óssea sobre as células neuronais e sobre a memória dos animais, visando estabelecer um paralelo com a ativação glial observada anteriormente pela injeção das CTMs.

MÉTODOS

As CTMs foram extraídas de medula óssea de ratos Wistar adultos e mantidas em H-DMEM 10% SFB (Da Silva Meireles e Nanci, 2003; Horn et al., 2009), sendo utilizadas entre a 10ª e a 20ª passagens.

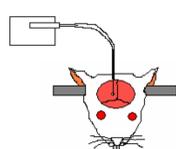
Ratos Wistar de 30 dias foram devidamente anestesiados com ketamina e xilasina e submetidos a cirurgia estereotáxica.



100.000 CTM foram ressuspendidas em 3µL de HBSS

A suspensão foi injetada no hipocampo direito nas coordenadas correspondentes:

Ântero-posterior -3,5
Médio-lateral +2,0
Dorso-ventral -2,7



Após 3 dias de recuperação as ratos foram eutanasiadas e os hipocampus foram separados e lisados

Após 7 dias de recuperação foi realizado o teste de reconhecimento de objetos para memória de curta e longa duração

As proteínas foram separadas pela técnica de Western Blotting. O imunocintidade de Neu N e β-tubulina 3 foram analisados.

As bandas obtidas no Western blotting foram quantificadas pelo programa Optiquant.

RESULTADOS

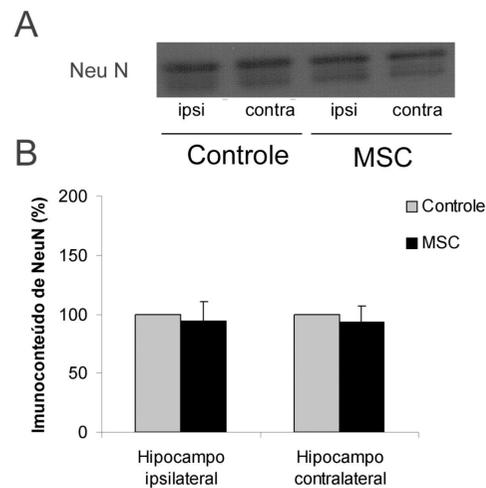


Figura 2: Imunocintidade de Neu N 3 dias após a administração de CTM no hipocampo de ratos Wistar. (A) Imagem representativa do imunocintidade de Neu N nos grupos controle e CTM. (B) Quantificação do imunocintidade de Neu N apresentado como percentual em relação aos controles (n=5, ANOVA, p>0,05).

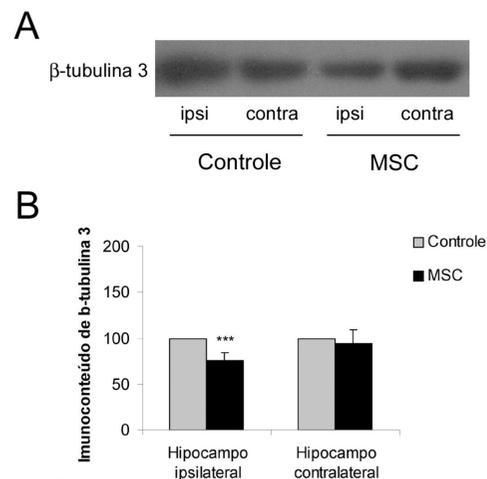


Figura 3: Imunocintidade de β-tubulina 3 3 dias após a administração de CTM no hipocampo de ratos Wistar. (A) Imagem representativa do imunocintidade de β-tubulina 3 nos grupos controle e CTM. (B) Quantificação do imunocintidade de β-tubulina 3 apresentado como percentual em relação aos controles (n=7, média±DP, ANOVA seguida de Tukey, p<0,001).

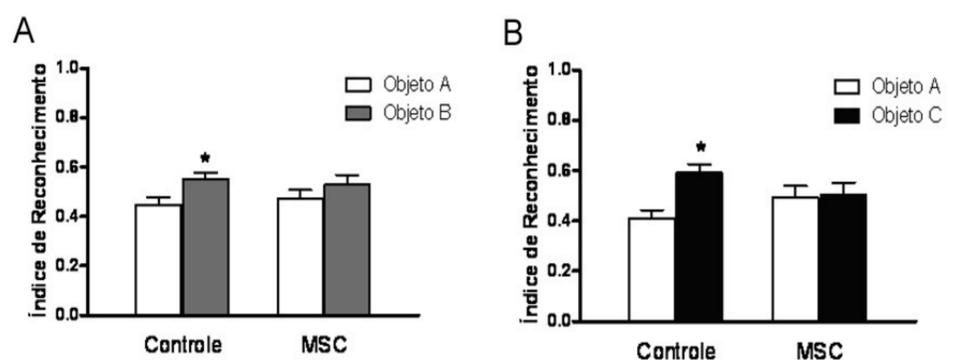


Figura 4: Representação gráfica do teste comportamental de reconhecimento de objetos. (A) Teste de memória de curta duração. (B) Teste de memória de longa duração (n=7, teste t para amostras não pareadas, * p<0,05).

CONCLUSÕES

- ✓ Não houve diferenças no imunocintidade de Neu N sugerindo que não há perda neuronal;
- ✓ Houve uma redução no imunocintidade de β-tubulina 3 no hipocampo ipsilateral, o que sugere uma retração nos processos neuronais;
- ✓ Não observou-se diferenças no teste comportamental de reconhecimento de objetos nos ratos que receberam as CTMs, sugerindo que a retração neuronal pode levar a um déficit de memória nos animais injetados.

APOIO