

Obtenção e caracterização imunofenotípica de células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas humanas obtidas de sangue e cordão umbilical humano

Cristiane Scher 1; Raquel Fernandes 2,3; Kerlin Quintiliano 1; Thayane Crestani 1; Marcelo Zubaran Goldani 3; Patricia Pranke 1,4

1 Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia; 2 Grupo Hospitalar Conceição; 3 Programa de Pós-graduação em saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 4 Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre, Brasil.

INTRODUÇÃO

O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) é uma fonte rica em células-tronco hematopoéticas (CTHs) e o cordão umbilical humano (CUH) fonte importante de células-tronco mesenquimais (CTMs). Em diversas situações, essas fontes de células-tronco (CT) apresentam vantagens, quando comparadas à medula óssea, no transplante alogênico, tais como oferta ilimitada, por serem fontes não invasivas, bem como provocarem menor reação imunológica. Com isso, o seu uso clínico tem sido visto como uma nova alternativa de tratamento.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos: (1) padronizar a extração de CTMs a partir do CUH; (2) quantificar as CTHs e CTMs no SCUP de neonatos prematuros e nascidos a termo; (3) comparar o perfil imunofenotípico das CTHs e CTMs dos neonatos considerando idade gestacional (IG) e peso do RN.



Figura 1: coleta do SCUP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a extração das CTMs a partir do CUH, utilizaram-se 6 amostras de CUH de neonatos (5 meninos e 1 menina) coletadas após o nascimento por cesárea no Centro Obstétrico (CO) do Hospital Moinhos de Vento. Todas as amostras foram obtidas de recém-nascidos a termo, com idade gestacional de $37 \pm 4,0$ semanas (média \pm desvio-padrão), idade materna de $32,6 \pm 5,7$ anos e peso do neonato de 3.329 ± 362 g. Após obtenção e acondicionamento de 8 cm do CUH, as amostras foram processadas em até 24 horas, conforme protocolo de cultivo das CTMs, passando por métodos de diferenciação na quinta passagem. A comparação do perfil imunofenotípico de recém nascidos pré-termo (RNPT) em relação aos recém-nascidos a termo (RNT) e a quantificação de CTHs foram avaliadas por citometria de fluxo do SCUP à fresco. As amostras de SCU foram colhidas no CO do Hospital Conceição (Fig.1), do Grupo Hospitalar Conceição, em dois grupos: RNPT: IG entre 24 e 36 semanas, e RNT: IG com 37 ou mais semanas. Ao total, 37 amostras de SCUP foram analisadas e avaliadas por citometria de fluxo - FACSCalibur (BD Biosciences). Controles isotipos foram utilizados para evitar a rotulagem inespecífica e 7AAD foi usado para excluir as células não-viáveis. Foram utilizados marcadores com fluorescência FITC ou PE: CD29, CD34, CD38, CD44, CD117, CD133, CD184, HLA-DR, CD146 e STRO-1.

RESULTADOS

Após a quinta passagem de cultivo das células do CUH, houve a caracterização, com sucesso, como CTMs, visto que mostraram capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas (Fig.2): osteogênica, condrogênica e adipogênica, bem como apresentaram positividade para os marcadores CD29, CD44 e CD90 e negatividade para marcadores de CTHs. Em relação ao perfil imunofenotípico e a quantificação de CTHs, os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos comparados, sem correlação entre o número de células CD34 positivas e os parâmetros fisiológicos estudados (CD34 e IG, $r = 0.281$, $p > 0.05$; CD34 e peso do RN, $r = 0.222$, $p > 0.05$). No entanto, quando o grupo de RNPT de muito baixo peso (< 1.000 g) foram excluídos, sugere-se uma correlação entre a quantidade de células CD34 e peso ao nascer ($r=0,323$, $p=0,07$), porém ainda não demonstrada estatisticamente.

DISCUSSÃO

Com a diferenciação das CTMs na quinta passagem nas três linhagens germinativas, bem como a caracterização imunofenotípica com positivities para os marcadores CD29, CD44 e CD90 e negatividade para marcadores de CTHs, demonstrou-se a efetividade do método utilizado para isolamento de CTMs a partir do CUH. O estudo do perfil imunofenotípico e da quantificação de CTHs em SCUP de RNPT e RNT ainda está em andamento para aumentar o número de amostras de RNPT de forma que seja possível confirmar a aparente diferença entre os grupos estudados. Se a diferença entre os grupos for significativa, suger-se-á que a coleta de SCUP poderia começar a partir de 34 semanas de gestação, ampliando assim a oferta e reduzindo-se o volume de SCUP coletado.

REFERÊNCIAS

- Okamoto KO, Campos AH. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. *Einstein*. 2(4) (2004): 355-358
- Brocklebank A, Sparrow R. Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 46 (2001): 254-261
- Protocolo: <http://www.ufrgs.br/immunogenetica/> acesso em março, 2010.
- Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*.2006;(174):249-82.

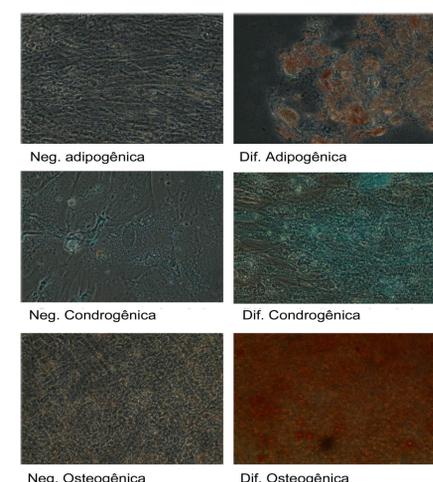


Figura 2: Diferenciação das CTMs. Controle negativo e diferenciação no tipo celular citado. (400X)

APOIO FINANCEIRO