



Artigo original

Células mesenquimais do estroma da medula óssea tratadas com extrato de tendão bovino adquirem o fenótipo de tenócitos maduros[☆]



Lívia Maria Mendonça Augusto*, Diego Pinheiro Aguiar, Danielle Cabral Bonfim, Amanda dos Santos Cavalcanti, Priscila Ladeira Casado e Maria Eugênia Leite Duarte

Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 20 de outubro de 2014

Aceito em 3 de fevereiro de 2015

On-line em 3 de outubro de 2015

Palavras-chave:

Tendão

Células mesenquimais do estroma da medula óssea

Tenócitos

R E S U M O

Objetivo: O estudo avalia a diferenciação *in vitro* das células mesenquimais isoladas do estroma da medula óssea em tenócitos após tratamento com extrato de tendão bovino.

Métodos: Tendões bovinos foram usados para confecção do extrato e estocados a -80°C . Células mesenquimais do estroma da medula óssea (BMSCs) de três doadores foram usadas para os testes de citotoxicidade por MTT e diferenciação celular por qPCR.

Resultados: Os dados mostram que células mesenquimais do estroma da medula óssea tratadas por até 21 dias em presença do extrato de tendão bovino diluído em concentrações crescentes (1:10, 1:50 e 1:250) promovem a ativação da expressão de biglican, colágeno tipo I e fibromodulina.

Conclusão: Nossos resultados mostram que o extrato de tendão bovino é capaz de promover a diferenciação das BMSCs em tenócitos.

© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Mesenchymal stromal cells from bone marrow treated with bovine tendon extract acquire the phenotype of mature tenocytes

A B S T R A C T

Objective: This study evaluated *in vitro* differentiation of mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, in tenocytes after treatment with bovine tendon extract.

Methods: Bovine tendons were used for preparation of the extract and were stored at -80°C . Mesenchymal stromal cells from the bone marrow of three donors were used for cytotoxicity tests by means of MTT and cell differentiation by means of qPCR.

Results: The data showed that mesenchymal stromal cells from bone marrow treated for up to 21 days in the presence of bovine tendon extract diluted at diminishing

Keywords:

Tendon

Mesenchymal stromal cells from bone marrow

Tenocytes

[☆] Trabalho desenvolvido no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (Into), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mails: liviaaugusto@gmail.com, livia-augusto@hotmail.com (L.M.M. Augusto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2015.02.006>

0102-3616/© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

concentrations (1:10, 1:50 and 1:250) promoted activation of biglycan, collagen type I and fibromodulin expression.

Conclusion: Our results show that bovine tendon extract is capable of promoting differentiation of bone marrow stromal cells in tenocytes.

© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

O tendão é um tecido especializado composto por tendoblastos e tenócitos embebidos em uma matriz extracelular composta majoritariamente por Colágeno tipo I. Os tenócitos têm potencial limitado de proliferação e conferem, assim, uma baixa capacidade regenerativa ao tendão.^{1,2}

As lesões tendíneas constituem um grave problema na prática ortopédica e geram altos custos para o sistema público de saúde, além de impactar na qualidade de vida dos pacientes afetados. Embora os tratamentos clínicos objetivem a regeneração, os métodos atualmente disponíveis ainda são ineficazes. Dessa forma, disfunções no tendão levam à incapacidade física definitiva.³⁻⁵

As células mesenquimais isoladas do estroma da medula óssea (BMSCs, do inglês, *Bone Marrow Stromal Cells*) são conhecidamente uma opção terapêutica promissora no campo da terapia celular e bioengenharia de tecidos musculoesqueléticos.⁵⁻⁸ Não obstante, sua associação a biomateriais sintéticos tem sido proposta como opção aos tratamentos modernos que visam à reconstrução tendínea, como a enxertia alógena, autógena ou xenógena.^{9,10} O uso de BMSCs autólogas em enxertos biossintéticos visa a melhorar os resultados de cirurgias conservadoras e reduzir o tempo de recuperação das propriedades biomecânicas pré-lesionais.¹¹ Além disso, a baixa imunogenicidade das BMSCs permite seu uso alógeno e minimiza a necessidade de imunossupressão do receptor.¹²

Apesar de seu significativo potencial terapêutico, pouco ainda se sabe acerca dos mecanismos e das vias de sinalização envolvidos na determinação e progressão da diferenciação das BMSCs para a via tenogênica. Considerando que BMSCs parecem responder a estímulos presentes em extratos de tecidos maduros saudáveis e apresentam características fenotípicas específicas,^{13,14} desenvolvemos a hipótese de que extratos de tendão pudessem induzir a diferenciação das BMSCs em tenócitos. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do tratamento de BMSCs humanas com diferentes concentrações de extrato de tendão bovino na diferenciação *in vitro* para a via tenocítica.

Material e métodos

Isolamento e expansão das células mesenquimais do estroma da medula óssea humana

As BMSCs foram isoladas a partir de descartes cirúrgicos de artroplastia de quadril obtidos de cinco pacientes (dois homens e três mulheres) entre 45-60 anos, sem comorbidades.

O consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos após a aprovação do protocolo do estudo pelo Comitê de Ética Institucional. Após a coleta no centro cirúrgico, as amostras foram armazenadas em frascos estéreis com o meio de cultivo de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island, NY) a 4° C por até 18 horas. Para o isolamento da fração celular total, as medulas foram ressuspensas em solução salina tamponada (PBS, Phosphate Buffer Saline) e mecanicamente dissociadas de fragmentos ósseos. As suspensões celulares obtidas foram coletadas em tubos de 50 mL e centrifugadas por 5 min a 836 xg a 4 °C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 50 mL de IMDM suplementado com 20% de SFB e contadas com uma câmara de Neubauer. Depois, 6×10^5 células mononucleares foram distribuídas em frascos de cultura de 75 cm² em 10 mL de IMDM com 20% de SFB e acondicionadas a 37 °C e 5% CO₂. Após três dias, a fração não aderente foi removida por meio de lavagem com PBS e o meio de cultivo trocado. Após 14 dias, as células foram removidas com solução de Tripsina 0,125% EDTA 0,78 mM e expandidas.

Preparo do extrato de tendão bovino

Foram obtidos cinco tendões de calcâneo bovino. Os tendões foram macerados mecanicamente e em seguida triturados com um homogeneizador elétrico de 20 Watts de potência, na proporção de 1 g de tecido para 2 mL de IMDM sem SFB.¹⁵ O extrato do tecido foi centrifugado a 836 g por cinco minutos a 8 °C e posteriormente acondicionado a -80 °C por no máximo dois meses.

Análise da viabilidade celular pelo método de MTT

BMSCs foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço e tratadas com extrato de tendão bovino diluído nas proporções de 1:10, 1:50 ou 1:250 v/v em meio IMDM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A viabilidade celular foi avaliada após 24, 72, 120 e 168 horas após o tratamento, na presença de MTT (*thiazolyl blue tetrazolium bromide*, Sigma Aldrich) na concentração de 25 mg/mL. Concentrações iguais de dimetilsulfóxido (DMSO) foram usadas como controle negativo. A avaliação colorimétrica foi feita em comprimento de onda de 550 nm, com o leitor SIRIO S SEAC (Burladingen, Alemanha).

Análise da expressão gênica por qPCR

BMSCs foram cultivadas sob as diferentes condições experimentais descritas anteriormente (1:10, 1:50 ou 1:250 v/v) por

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2713093>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2713093>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)