

JOÃO LUIZ VIEIRA DA SILVA

**ATIVIDADE CICATRICAL DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE
DENTES DECÍDUOS HUMANOS NO TRATAMENTO DE LESÕES DE TENDÕES
DE AQUILES DE RATOS**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Artroscopia e Traumatologia do Esporte, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Artroscopia e Traumatologia do Esporte.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Stieven Filho

CURTIBA

2014

JOÃO LUIZ VIEIRA DA SILVA

**ATIVIDADE CICATRICAL DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE
DENTES DECÍDUOS HUMANOS NO TRATAMENTO DE LESÕES DE TENDÕES
DE AQUILES DE RATOS**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Artroscopia e Traumatologia do Esporte, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Artroscopia e Traumatologia do Esporte.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Stieven Filho

CURTIBA

2014

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
3 MATERIAL E MÉTODO	12
4 RESULTADOS.....	16
4.1 VIABILIDADE CELULAR.....	16
4.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – ESTUDO PILOTO.....	17
4.3 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – INDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO.....	20
4.4 EUTANÁSIA E COLETA DOS TENDÕES	25
4.5 MICROSCOPIA.....	25
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

ATIVIDADE CICATRICIAL DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS NO TRATAMENTO DE LESÕES DE TENDÕES DE AQUILES DE RATOS

Lesões em tendões são comumente observadas na prática clínica e podem se desencadear em uma morbidade significativa. Os tendões são estruturas pouco vascularizadas por isso tem um baixo potencial de cicatrização. O organismo é capaz de curar a maioria das lesões formando uma cicatriz fibrosa, porém essas fibras ficam dispostas aleatoriamente, fazendo com que as atividades mecânicas e bioquímicas não sejam as mesmas de um tendão sem lesões. Uma vez cicatrizado o tendão não terá a mesma resistência a tração, e ficará propenso a novas lesões resultando na mudança do estilo de vida do paciente. Estudos de cicatrização têm sido realizados visando o desenvolvimento de novas terapias celulares e genéticas para a restauração funcional dos tecidos. O objetivo desse estudo é avaliar a atividade cicatricial induzida pelas células-tronco de origem da polpa dentária de decíduos humanos, no tratamento de tendinopatia induzida em tendões de Aquiles de ratos.

Descritores: células tronco , cicatrização, tendão de Aquiles

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O organismo humano é capaz de curar a maioria das lesões teciduais de tendões com a formação de cicatriz fibrosa, onde essas fibras permanecem aleatoriamente dispostas, em todas as direções, fazendo com que propriedades mecânicas e bioquímicas após a cicatrização do tendão lesionado, não sejam iguais ao tendão intacto¹.

Estratégias para um reparo bem sucedido de tecido tendinoso, com células-tronco mesenquimais (MSCs), foram descritas em vários estudos. Mesmo assim, existe uma carência de estudos que relatos exploram, com maior aprofundamento, a diferenciação do tenócito de MSCs humanas de tecido adiposo ou medula óssea. Esta área de pesquisa merece uma análise mais minuciosa. O recente isolamento de células-tronco multipotentes de tendões, podem lançar luz sobre este assunto^{3,6}.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Tendinopatia é o termo mais utilizado para designar qualquer lesão nos tendões sem importar a causa^{7,8}. Lesões em tendões são de alta incidência e quando tratados de forma não cirúrgica, são de longa duração^{7,9}.

Os tendões, normalmente curam-se com fibrose e tecido cicatricial¹⁰, e apesar da remodelação, as propriedades do tendão cicatrizado nunca irá corresponder aos de um tendão intacto¹¹. O tecido cicatricial possui uma resistência mecânica inferior o que o torna propenso às novas lesões, resultando em mudança no estilo de vida e restrições a determinadas atividades para o paciente¹⁰.

O uso de corticóide injetável local ou sistêmico vem sendo utilizado pelos ortopedistas em lesões crônicas do tendão de Aquiles devido aos diversos casos de ruptura espontânea¹² pois sabe-se que ele atua inibindo a síntese de colágeno (componente fundamental para cicatrização), porém o corticóide ainda é bastante utilizado por ser um potente anti-inflamatório¹¹. Shrier et al observou uma diminuição da resistência do tendão de Aquiles após a injeção sequencial de corticóide em animais¹³.

Estudos pré-clínicos mostram que a terapia com células têm o potencial para regenerar o tecido do tendão em vez de fazer apenas reparação, é um processo denominado tenogênese. Mesmo que as terapias celulares ofereçam algum potencial no tratamento de distúrbios do tendão, houve poucos ensaios clínicos publicados para determinar a fonte ideal e o correto de células para se administrar¹⁰.

Estudos de cicatrização tendinosa têm sido realizados, principalmente, em tendões seccionados de animais ou tendões rompidos de seres humanos. Devido a este fato, respostas para tendões degenerados em humanos, ainda permanecem obscuras¹.

As células tronco mesenquimais (MSCs), tem capacidade de auto-renovação e podem se diferenciar em várias linhagens de células^{10,11}. Devido a estas propriedades, poderiam melhorar a arquitetura do tendão^{3,5}. MSCs podem ser isoladas de vários tecidos como placenta, medula óssea, músculo humano, adipócitos além de outros^{10,14,15}.

Estratégias para um reparo bem sucedido de tecido tendinoso, com células-tronco mesenquimais (MSCs), foram descritas em vários estudos. MSCs com

compósitos de colágeno utilizados para reparo do tendão patelar, o que resultou em uma maior capacidade em resistir às tensões ^{1,2}.

As primeiras descrições, em modelos não-humanos, mostram a capacidade das células-tronco mesenquimais da medula óssea em apresentar alterações morfológicas nucleares e alinhamento longitudinal para sua diferenciação em tenócitos^{3,4}. As propriedades dos tendões poderiam ser melhoradas pela combinação de MSCs com um biomaterial composto sintetizado in vitro utilizando biorreatores. A adição de um colágeno tipo I ajudou a assimilar rigidez ao material sendo resistente a uma série de forças em tendões patelares in vivo^{3,5}. Mesmo assim, existe uma carência de estudos que relatos exploram, com amior aprofundamento, a diferenciação do tenócito de MSCs humanas de tecido adiposo ou medula óssea^{3,6}.

As células-tronco isoladas de tecido pulpar de dentes decíduos são capazes de se diferenciar em uma variedade de células: células neurais, osteoblastos, condrócitos, adipócitos e miócitos^{16,17,18}. Assim sendo, o objetivo deste projeto é avaliar a capacidade regenerativa do tendão de Aquiles de ratos, pós-secção e após injeção de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido pulpar dental.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa utilizou as células-tronco de polpa dental humana obtidas por meio do Projeto de Pesquisa registrado no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (SISNEP) sob o número CAAE: 0060.0.094.094-10e aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo, sob protocolo nº. 071/2010.

Células-tronco oriundas de tecidos odontológicos plástico-aderentes de 4^a a 8^a de passagem foram lavadas com PBS, incubadas por 5-7 minutos a 37°C com tripsina 0,05% + EDTA 0,02% e a tripsina neutralizada com o Meio de Cultivo, conforme descrito no ítem anterior. As células foram contadas a partir de uma alíquota de cada amostra coletada e em seguida cada amostra em separado foi centrifugada, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido e misturado ao PBS numa proporção de 1×10^6 células-tronco a cada 1000µl de solução. Em seguida a suspensão celular foi acondicionada em seringas de 5ml e mantidas em caixas térmicas na temperatura de 4°C durante o transporte até o centro cirúrgico do biotério da Universidade Positivo para a sua utilização nos experimentos.

As experiências com animais foram realizados nos termos institucionais de acordo com a normas previstas na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e após aprovação da Comissão de Ética do uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo (UP).

Ratos da raça *Wistar* pesando entre 250 a 300g compuseram a amostra para o estudo, num total de 16 animais. Foram divididos em 2 grupos: 1) Grupo controle (secção da porção média do tendão + sutura com fio mononylon 3.0 + injeção de PBS), grupo tratado apenas com PBS. Logo após a cirurgia, foi realizada a injeção de 0,5 ml de solução de PBS no local da lesão. 2) Grupo tratado (secção da porção média do tendão + sutura com fio mononylon 3.0 + injeção de células tronco em solução de PBS), logo após a cirurgia, no local da lesão foi realizada a injeção de 0,5 ml de solução de PBS + células-tronco, em uma concentração de 1 milhão de células em 0,5ml. Cada grupo foi composto por 16 ratos.

Os animais foram submetidos à anestesia geral, primeiramente com indução anestésica de isoflurano, com inalação em campânula de vidro, e

posteriormente foi administrada, por via intramuscular na região do quadríceps e parte posterior da coxa, com agulha 25x5, aproximadamente 0,5 ml de uma associação de cloridrato de ketamina (80mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg).²¹

A analgesia foi realizada com o uso de morfina em dose única de 0,1 mL/animal, logo após o término do procedimento cirúrgico e acetaminofeno (paracetamol) líquido em dose diária de 200mg/animal/dia o qual foi administrado via oral administrado na água, durante 3 dias.

Após as cirurgias, os animais foram alojados em gaiolas plásticas de 49x34x16 cm, num total de 4 (quatro) animais por caixa, deixadas em ambiente arejado, com iluminação ambiente e controle de ruídos. As caixas se mantiveram sempre forradas com raspas de madeira, com a finalidade de absorver a urina dos animais forradas com raspas de madeira. As mesmas foram disponibilizadas pelo Biotério da Universidade Positivo.

Os animais foram marcados nas caudas com caneta marcadora para a melhor identificação.

O procedimento de eutanásia foi realizado após 14 dias do procedimento cirúrgico e injeções, em câmara de CO₂, por aproximadamente 10 minutos. O descarte dos animais eutanasiados após a coleta das amostras obedeceu às regras do Biotério da Universidade Positivo.

Imediatamente após a eutanásia, foram expostos e removidos os tendões de Aquiles dos animais para estudo, através de incisão longitudinal posterior, com bisturi nº 15, pinça dente de rato, e tesoura de dissecação.

Foram coletados os tendões inteiros de cada rato, que foram, imediatamente fixados em formalina tamponada 10%, por 24 horas, a 4°C. Em seguida foram encaminhadas para o processamento histológico.

Para análise histológica, as amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (Sigma) incorporadas a parafina. Foi realizada hemiseção do fragmento cirúrgico em secção longitudinal e cada peça foi diafanizada e parafinada em cassetes para cortes histológicos. Com auxílio de micrótomo, cortes de 3 µm de cada espécime foi obtido e foram submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina que consistiu nos seguintes passos:

Desparafinização em dois banhos distintos em xilol por 5 minutos

Hidratação em cadeia descendente de álcool 20 minutos

Álcool absoluto - dois banhos de 5 minutos cada

Álcool 80% - um banho de 5 minutos

Álcool 70% - um banho de 5 minutos

Coloração em solução de hematoxilina de Harris por 3 minutos

Lavagem em água corrente por 2 minutos

Coloração em eosina 1 minuto

Lavagem em água corrente por 3 minutos

Desidratação dos espécimes em solução alcoólica

Álcool 70% - um banho de 5 minutos

Álcool 80% - um banho de 5

Álcool absoluto - dois banhos de 5 minutos cada minutos

Diafanização dos cortes em solução álcool/ xilol (proporção 1:1)

Dois banhos de xilol - 5 minutos cada

Montagem das lâminas em Permount

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

Após várias padronizações das células tronco com diferentes tipos de matriz e ácido hialurônico, optou-se pelo PBS como solução veículo. A solução de PBS demonstrou manter a viabilidade celular em 95,74%, é uma solução inerte e que não terá influência no processo de avaliação cicatricial. No grupo controle será injetado apenas PBS e no grupo tratado (PBS+ células tronco).

Abaixo seguem valores e imagens dos resultados de contagem obtidos com as células tronco mantidas em PBS através de dois corante diferentes: neutral red e azul de tripan.

Poços PBS: média da contagem: Total: $45/4 = 11,25 \times 2 = 22,5 \times 10^4$ em 1ml.

Para 2ml: 450.000 células.

Total de células mortas: $2/4 = 0,5 \times 2 = 1 \times 10^4$. Em 2ml = 20.000.

Viabilidade: 95,74%.

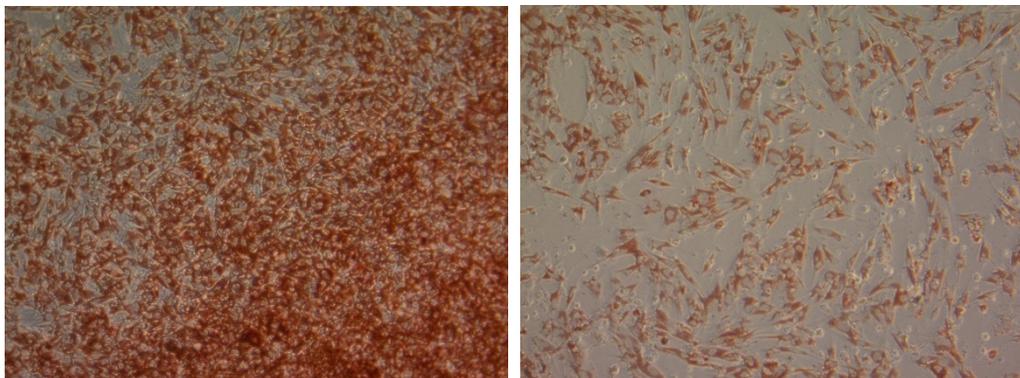


Figura 1: Avaliação da Viabilidade Celular de Células tronco mesenquimais em PBS através do Neutral Red

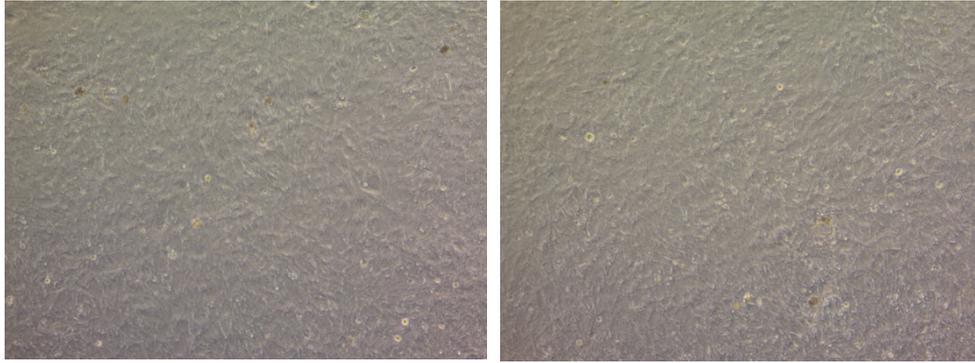


Figura 2: Avaliação da viabilidade celular de células tronco mesenquimais em PBS através do Azul de Tripán

Estes resultados demonstraram que o PBS mantém a viabilidade celular e as características morfológicas das células tronco mesenquimais originárias da polpa dentária.

4.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – ESTUDO PILOTO

A padronização do modelo da indução do rompimento do lesão de Aquiles foi realizado em ratos cadáver, com o objetivo de padronizar todas as etapas cirúrgicas às quais os animais serão submetidos. As imagens abaixo ilustram todas as etapas:



Figura 3: incisão da pele e rompimento do tendão de Aquiles



Figura 4: sutura do tendão e da pele após indução da lesão



Figura 5: injeção da solução de PBS com ou sem células tronco no local da indução da lesão no tendão de Aquiles



Figura 6: imobilização do membro inferior após indução da lesão, injeção do PBS com ou sem células tronco e sutura.

4.3 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – INDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO

Após obtidas as padronizações no projeto piloto, os experimentos cirúrgicos foram realizados conforme imagens abaixo, ilustram:



Figura 7: inalação do Isofurano, em campânula de vidro, para a anestesia do animal



Figura 8: aplicação de 0,5 ml da associação de cloridrato de ketamina (80mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg), também para a anestesia do animal.

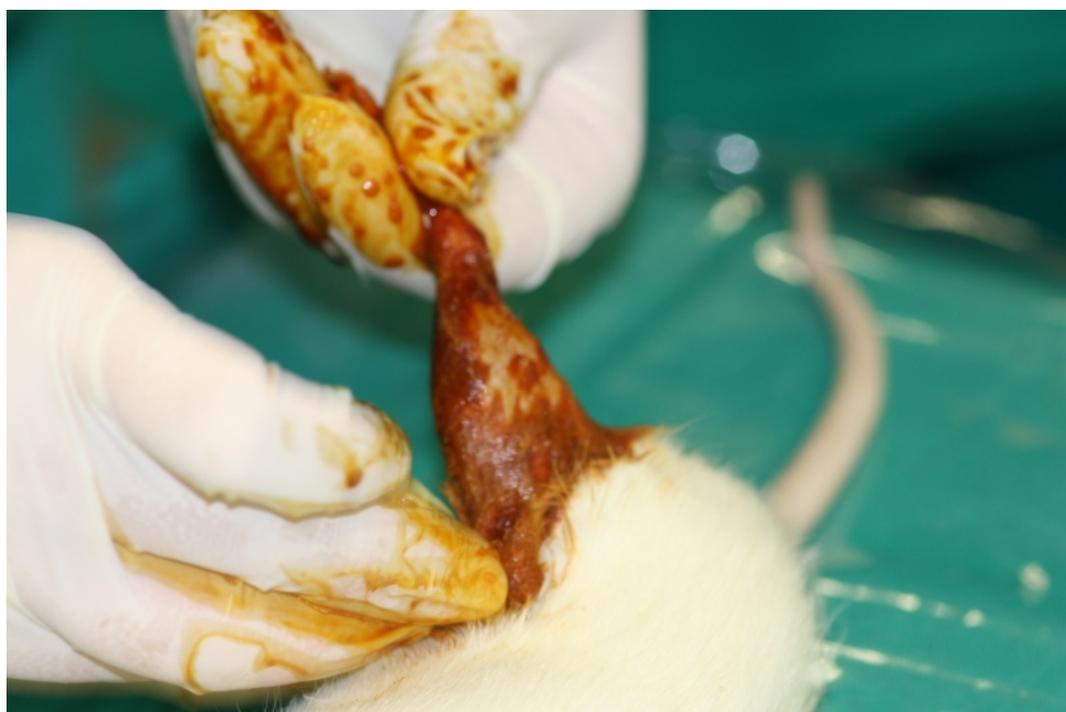


Figura 9: assepsia se do membro traseiro direito do animal.



Figura 10: incisão da pele do animal



Figura 11: cote do tendão do animal



Figura 12: sutura do tendão do animal



Figura 13: sutura da pele do animal



Figura 14: aplicação de PBS ou células troco



Figura 15: atadura após a cirurgia

4.4 EUTANÁSIA E COLETA DOS TENDÕES

As eutanásias foram feitas em câmara de CO₂. A retirada dos tendões foi padronizada. Logo após a retirada, os tendões foram colocados em formol 10%, em uma proporção 1:10, para que o tecido não deteriorasse antes da realização das análises histológicas.

4.5 MICROSCOPIA

Todos os espécimes estudados (grupo PBS caixa 1 e 2 e grupo T caixa 1 e 2) revelaram aspecto microscópico similar.

Em todos os casos foram identificados aspecto histológico de fibrose, composta por intensa deposição de fibras colágenas densas, ora modelada, ora difusa, com aspecto desmosplásico (seta figura 16), por entre as quais se encontram células fibroblásticas isoladas sem aspectos atípicos.

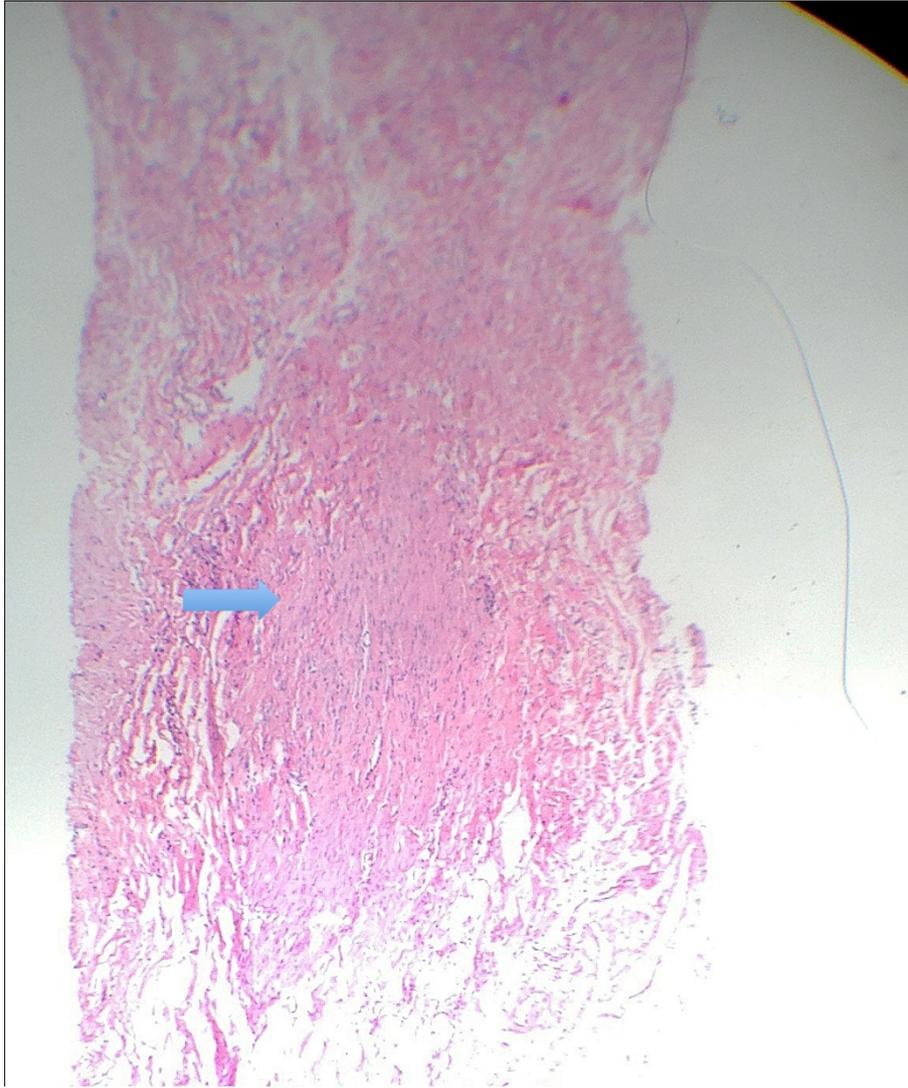


Figura 16: corte histológico de tendão de Aquiles de rato, com células tronco.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Muitos estudos demonstram os efeitos benéficos das células-tronco mesenquimais sobre a velocidade cicatricial dos tendões¹⁰, entretanto, neste estudo os grupos tratados com essas células não apresentaram dados histológicos que indiquem uma possível melhora na cicatrização no tempo estudado.

O que se notou nos resultados histológicos foi que a quantidade de deposição de tecido fibroso é variável ente os espécimes, mas é similar intergrupos, uma análise quantitativa de tecido depositado seria um inferencia, uma vez que o defeito criado não é critico e a área do defeito foi suturada e não há a variante migração celular nesses tipos de defeito.

Pode-se também observar que não houve nenhum tipo de processo inflamatório que indiquem rejeição das células-tronco de origem humana nos animais. Sugere-se a necessidade de novos estudos, utilizando diferentes tempos de eutanásia para melhor interpretação da cicatrização nos resultados histológicos.

Apesar de não terem sido encontradas melhorias nos sinais de cicatrização, alguns dados puderam ser levantados, como o fato de não ter ocorrido nenhum tipo de reação imunológica do hospedeiro contra o enxerto, um argumento favorável à continuidade da pesquisa com células-tronco de origem odontológica para desenvolvimento de terapias, utilizando outros tempos para a eutanásia.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi realizado, podemos constatar que os parâmetros histopatológicos avaliados não apresentaram diferenças entre os grupos, no tempo avaliado.

REFERÊNCIAS

1. Hoffmann A, Gross G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *International Orthopaedics (SICOT)* 2007; 31:791–797.
2. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003; 21:420–431.
3. Gimble J. et al. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother* 2008;35:228–238
4. Awad HA. et al. In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J Biomed Mater Res* 2000;51:233–240.
5. Juncosa-Melvin N. et al. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2006;12:369–379.
6. Bi Y, Ehrlichou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF: Identification of tendon stem/ progenitor cells and the role of the extra cellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007;13: 1219–1227.
7. Silva R, Glazebrook M, Campos V, and Vasconcelos A. Achilles tendinosis - a morphometrical study in a rat model. *Int J Clin Exp Pathol* . 2011; 4(7):683-691.
8. Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse Tendon Conditions: Time to Change a Confusing Terminology. *Arthroscopy*. 1998; 14: 840-843.
9. Khan KM, Cook JL, Bonar SF, Harcourt P, Astrom M. Histopathology of Common Tendinopathies: Update and Implications for Clinical Management. *Sports Med*. 1999; 27: 393- 404.

10. Young M, StemCell Applications in Tendon Disorders: A Clinical Perspective. Hindawi Publishing Corporation, Stem Cells International 2012.

11. H. Obaid and D. Connell, "Cell therapy in tendon disorders: what is the current evidence?" *American Journal of Sports Medicine*. 2010; vol. 38, no. 10, pp. 2123–2132.

12. Tatari H, Kosay C, Baran O, Ozcan O and Ozer E. Delleterious effects of local corticosteroids injections on the Achilles tendon of rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001; 121 : 333 – 337.

13. Shrier I, Matheson GO, Kohl HW. Achilles tendonitis: are corticosteroid injections useful or harmful? *Clin J Sport Med*. 1996; 6: 245-250.

14. Z. Yin, X. Chen, J. L. Chen, and H.W. Ouyang, "Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration," *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010; vol. 10, no. 5, pp. 689–700.

15. Y. Bi, D. Ehrchiou, T. M. Kilts et al., Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche *Nature Medicine*. 2007; vol. 13, no. 10, pp. 1219–1227.

16. Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100, 5807–12.

17. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D et al. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006; 184, 105–16.

18. Wang J, Wang X, Sun Z et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells and Development*. 2010; 4, 1375–83.

- 19.S Toh W. et al. Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. *Biomaterials* ; 2010; 31: 6968-6980.
- 20.Heng BC, Cao T, Lee EH. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*. 2004; 22: 1152-67.
- 21.Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Ministério da Saúde. FIOCRUZ. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005.
- 22.Tatari H, Skiak E, Destan H, Ulukus C, Ozer E and Satoglu S.Effect of Hylam G-F 20 in Achilles Tendonitis: An experimental Study in Rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2004; 85:1470-4.
- 23.Toh WS, Lee EH, Richards M, Cao T. In vitro derivation of chondrogenic cells from human embryonic stem cells. *Methods MolBiol* 2010; 584: 317-31.
- 24.Balmain N, Moutahir F, Heizmann CW, et al. Immunolocalization of S100A2 calcium-binding protein in cartilage and bone cells. *Cell Mol. Biol* 2003; 49: 485-486.
- 25.Indelicato PA. Isolated medial collateral ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3: 9-14.