

# Monitorização de células-tronco mesenquimais injetadas via retrobulbar próximas ao nervo óptico lesados de coelhos

## *Monitoring of stem cells from adipose tissue injected via retrobulbar next to previously injured optic nerve of rabbits*

Marisa Braga Potério Santucci<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7017-5234>

Paulo Kharmandayan<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2645-3521>

Thiago Borsoi Ribeiro<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5231-5766>

Keila Miriam Monteiro de Carvalho<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7976-8017>

Ângela Cristina Malheiros Luzo<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1422-9119>

### RESUMO

**Objetivo:** Verificar a presença das células-tronco mesenquimais (MSC) na área próxima ao nervo óptico de coelhos previamente lesado com álcool absoluto. **Métodos:** Os 12 coelhos da raça Nova Zelândia foram distribuídos em 2 lotes. Após sedação, cada olho do animal recebeu uma injeção retrobulbar de 1 ml de álcool absoluto em um dos olhos e de 1 ml de solução fisiológica 0,9% (SF) no olho contralateral. Após 15 dias deste procedimento inicial todos os olhos dos animais pertencentes ao lote A, receberam via retrobulbar, uma solução contendo MSC de tecido adiposo humano e previamente marcadas com Qdots. Todos os olhos dos animais do lote B receberam solução PBS. **Resultados:** Após 15 dias desta última aplicação os animais foram sacrificados e as lâminas foram analisadas. A presença das MSC foi observada em 100% dos olhos dos animais do lote A. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a marcação prévia das MSC com Qdots permitiu o acompanhamento das mesmas na região aplicada e em áreas mais internas do nervo óptico. A permanência de MSC após 15 dias de aplicação ao redor do nervo óptico sugere a viabilidade e possível participação das mesmas no processo de regeneração do tecido lesado. Nas condições deste estudo, a via de aplicação retrobulbar permitiu a mobilização das células tronco do local de aplicação até áreas centrais dos nervos ópticos nos animais do lote A, sugerindo que esta poderá ser uma via de acesso eficaz para as MSC no processo de regeneração de neuropatias ópticas.

**Keywords:** Células tronco mesenquimais; Nervo óptico; Neuropatia; retrobulbar; Qdots; Coelhos

### ABSTRACT

**Objective:** To verify the presence of mesenchymal stem cells (MSC) in the area close to the optic nerve of previously injured with absolute alcohol. **Methods:** Twelve New Zealand breed rabbits were divided into two groups, and after sedation, each eye of the animal received a retrobulbar injection of 1 ml of absolute ethanol in one eye, and 1 ml of physiological solution 0.9% (PS) in the contralateral eye. After 15 days all eyes of animals belonging to group A, received via retrobulbar a solution containing MSCs from human adipose tissue (AT) and previously marked with Qdots, while all eyes of animals from group B received solution containing PBS. **Results:** The presence of MSC was observed in 100% of the eyes of the animals of group A and the more central areas near and into the optic nerve. **Conclusion:** The results suggest that the appointment of MSC with Qdots allowed their follow-up applied in the region and in the inner areas of the optic nerve. The MSC permanence after 15 days of application around the optic nerve suggests the feasibility and possible involvement of the same during the damaged tissue regeneration process. Under the conditions of this study, the route of retrobulbar application and the presence of the stem cells to the central areas of the optic nerves in animals of group A, suggests that this might be an effective approach for MSCs in regeneration process of optic neuropathies.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells; Optic nerve; Neuropathy; Qdots; Rabbits

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas – Hemocentro, Campinas, SP, Brasil.

Local onde foi realizada o trabalho: Departamento de Medicina Experimental da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) - UNICAMP / Departamento de Hematologia e de Oftalmologia - FCM - UNICAMP

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Recebido para publicação em 30/05/2019 - Aceito para publicação em 16/09/2019.

## INTRODUÇÃO

**D**e acordo com dados da OMS divulgados em 1990, no mundo havia cerca de 38 milhões de indivíduos cegos e outros 110 milhões de indivíduos com baixa visão e risco de cegueira. Até 2020, a cegueira poderá mutilar cerca 76 milhões de pessoas no mundo, principalmente motivada pela atrofia do nervo óptico.<sup>(1-4)</sup> A neuropatia definitiva pode resultar de doenças ou complicações como: o papiledema crônico provocado por tumores cerebrais (não ressecáveis ou após a ressecção), hemorragia do nervo óptico, síndrome da necrose retiniana aguda, oclusão de veia central da retina, neuropatia óptica isquêmica não arterítica, glaucoma, dentre outras.<sup>(5-7)</sup>

A neuropatia causada pelo glaucoma já é considerada a terceira principal causa de cegueira irreversível no mundo.<sup>(8-10)</sup> O melhor conhecimento da fisiopatologia e principalmente da química molecular dessa doença, propiciaram o surgimento de novas e promissoras perspectivas de tratamento: a terapêutica e a regenerativa. Dentro dessa ótica inovadora, com o advento da medicina regenerativa, vários estudos demonstraram, que as células-tronco tem grande capacidade de autogeração, proliferação, expansão e diferenciação, podendo inclusive reconstituir tecidos lesados e até formar um novo órgão.<sup>(11-13)</sup>

A capacidade de imunomodulação, aliada a falta de expressão dos antígenos de histocompatibilidade, faz com que as células mesenquimais (MSC) dentre as demais linhagens de células tronco, sejam provavelmente as ideais para uso nas técnicas de medicina regenerativa.<sup>(14,15)</sup>

A principal fonte de obtenção das células-tronco é a medula óssea, mas elas podem ser adquiridas de outros tecidos como sangue de cordão, fígado fetal, líquido amniótico, de polpa dentária e tecido adiposo. Embora, nos últimos anos, a utilização de sangue de cordão tenha sido facilitada pela adoção de uma política pública de incentivo aos bancos de sangue de cordão, outra fonte de aquisição de MSC que tende a ser muito útil é o tecido adiposo, em virtude da grande facilidade de coleta durante procedimentos de lipoaspiração.<sup>(16-19)</sup>

As células tronco provenientes de tecido adiposo (MSC), têm capacidade para diferenciar em células originárias de linhagem mesoderma (osso, cartilagem e tendões) assim como nas de linhagens endo e ectoderma podendo originar, dentre outras, os cardiomiócitos, neurônios e células hepáticas.<sup>(20-23)</sup>

Estudos de caracterização demonstraram que as MSC não expressam antígenos de histocompatibilidade, HLA, classe II, de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40, nem marcadores da linhagem hematopoiética CD45, CD3, CD31. Expressam HLA classe I, em pequena quantidade, o que diminui os índices de rejeição pelo hospedeiro. Possuem também capacidade de imunomodulação. Dependendo do estímulo imunossuprimem ou estimulam.

As MSC controlam a secreção de fatores antiproliferativos, inibindo a proliferação de linfócitos T e a ação citotóxica. Atuam também em linfócitos natural killer (NK) e impedem a maturação e a função de células dendríticas. Na presença de Interferon gama, as MSC acabam liberando para a superfície, os antígenos HLA classe I intranucleares, aumentando a imunogenicidade.<sup>(18, 24,25)</sup> Devido a capacidade de imunomodular a resposta imune e conduzir a regeneração tecidual, alguns estudos, com modelos animais, estão avaliando a potencialidade destas células no tratamento de doenças auto-imunes, como esclerose múltipla, diabetes, lupus eritematoso sistêmico, dentre outras.<sup>(18)</sup>

As células mesenquimais, quando aplicadas por via endovenosa em experimentos com ratos, diferenciam-se em células neuronais no sistema nervoso central.<sup>(26-28)</sup> Sasaki e colaboradores<sup>(29)</sup> mostraram que em ratos, as MSC são capazes de se diferenciar em fibras de mielina e de reparar a medula espinal ou seja, confirmaram que em condições apropriadas, estas células se diferenciam em neurônios.<sup>(14,15)</sup> Ainda na área de Oftalmologia há na literatura relatos de utilização de células neuronais de cérebro de animais recém nascidos ou embrionários para transplantes de retina.<sup>(14,15)</sup>

A viabilidade de desenvolvimento de terapia celular a partir de células tronco, em especial das MSC, em conjunto com a utilização de fatores indutores de diferenciação neuronal e a confirmação da penetração destas células em tecidos lesados estimulou a realização deste estudo.

## OBJETIVOS

Confirmar a presença das MSC provenientes do tecido adiposo nos nervos ópticos previamente lesados de coelhos. Analisar a eficácia da aplicação das MSC pela via retrobulbar e a participação das mesmas na regeneração do nervo óptico previamente lesado.

## MÉTODOS

Os experimentos em animais foram realizados no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As peças, com o material destinado ao estudo imunohistoquímico foram preparadas no Laboratório Experimental da Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, seguindo a técnica histológica para cortes em parafina. A extração, diferenciação cultura e expansão e análise imunofenotípica das células mesenquimais foram realizadas no laboratório de Biologia Celular do Hemocentro da UNICAMP. As análises de imunofluorescências das lâminas foram fotografadas no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular – INFABIC e no Laboratório de Biologia Celular do Hemocentro da UNICAMP

### 1. Fontes de obtenção de células mesenquimais

As MSC foram obtidas de tecido adiposo humano de pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração sob o efeito da anestesia geral no Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP (processo CEP-Nº 838/2008). Após esclarecimentos quanto a natureza do estudo, todos os pacientes submetidos à lipoaspiração que concordaram com a doação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram selecionados pacientes com idade entre 25 e 50 anos e excluídos pacientes diabéticos e hipertensos.

### 2. Obtenção de células mesenquimais

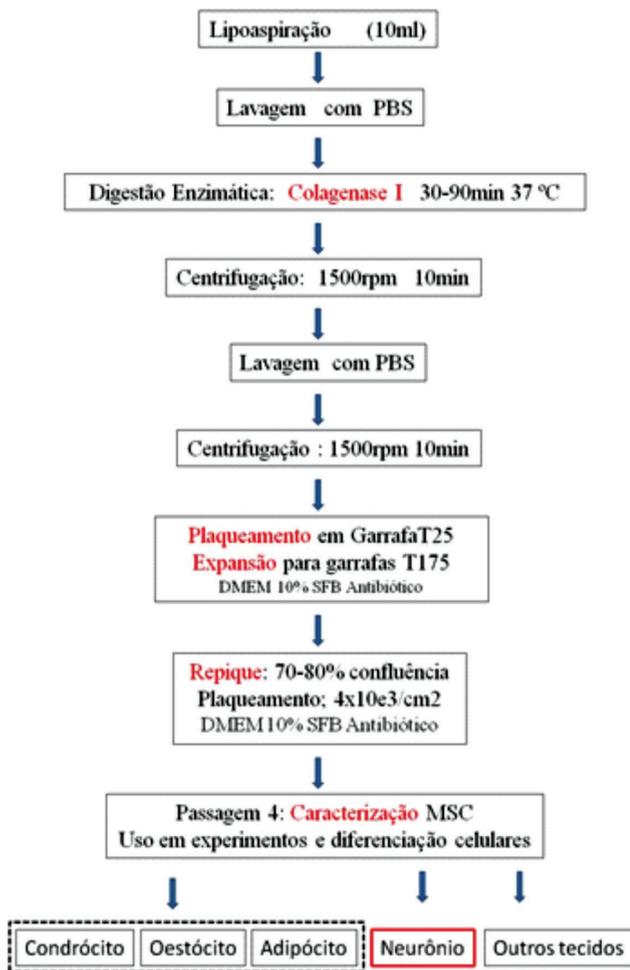
#### a. Tecido Adiposo

Após lipoaspiração, o material coletado foi submerso em uma solução tampão de fosfato (PBS-Phosphate Buffer Solution) estéril. Em seguida, o tecido adiposo obtido foi dissecado em pequenos fragmentos e lavado com PBS numa centrifugação de 1500 rpm por 8 minutos. Os fragmentos foram imersos em uma solução enzimática com Colagenase tipo I (1.5mg/mL), 25mM HEPES e albumina de soro bovino (BSA-20mg/ml) por 30-90 minutos a 37°C sob agitação contínua até a dissolução do tecido

gorduroso. A reação enzimática foi desativada pela adição de igual volume de DMEM-low glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Médium/Gibco, Rockville) com 10% soro fetal bovino (SFB) e centrifugada em rotação de 1500 rpm por 10 minutos. O pellet celular foi ressuscitado em tampão de lise de eritrócitos (pH 7,3) por 10 minutos e em seguida lavado em 40 ml de PBS gelado, a 1200g por 10min. Por final as células obtidas foram ressuscitadas em meio de cultura DMEM-low glucose, com 10% FBS e cultivadas numa densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%. Após 2-3 dias de incubação, as células foram lavadas com meio de cultura para a retirada de células mortas ou não aderentes.

**3. Expansão e cultura das células-tronco mesenquimais**

As células aderidas na placa de cultura foram incubadas por 5-7 dias em estufa a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95% com meio de cultura DMEN-low glucose / 10% FBS para proliferação. Quando atingiam a confluência de 70-80%, eram tripsinizadas (Trypsina, Gibco, Rockville), contadas (câmara de Neubauer) e distribuídas na concentração de aproximadamente  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> em meio de cultivo DMEM-LG/ 10% FSB com antibiótico. Após a quarta passagem as células aderentes eram caracterizadas como células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (Figura 1).



**Figura 1:** Obtenção de células-tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo

**4. Imunofenotipagem das células mesenquimais indiferenciadas por citometria de fluxo**

Após a quarta passagem, as células aderentes foram coletadas, lavadas e ressuscitadas em 50 µL de solução de lavagem (PBS1X sem Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>, 3%FCS, 10mM HEPES pH 7,2). Em seguida, foram adicionados os seguintes anticorpos: anti- CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD45 e anti-IGg (controle positivo). Para remover o excesso de anticorpo, as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem e centrifugadas a 220g por 5 minutos. Dez mil eventos foram adquiridos com um FACS Calibur (Becton–Dickinson, CA, USA) e analisados através do Cell Quest Software (Becton–Dickinson, San Jose, CA, EUA). A marcação não específica foi verificada a partir da intensidade de fluorescência do controle isotópico correspondente, subtraída do percentual de população positivo correspondente.

**5. Análise expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)**

O RNA total foi extraído a partir de células mesenquimais indiferenciadas (controle) e de células mesenquimais em diferentes fases do processo de diferenciação utilizando o Kit R Neasy® Micro Kit (Qiagen), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com enzima DNase I para eliminar contaminação de DNA genômico e quantificadas por espectrofotometria a 260nm. A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. As amostras de RNA tratadas foram transcritas em cDNA utilizando a enzima SuperScript III e também quantificadas por espectrofotometria a 260nm. A análise da expressão gênica foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real no equipamento ABI 5700 utilizando o reagente SYBRGreen. Foram analisados os genes Colágeno II, Agrecano e SOX 9 para a caracterização da diferenciação em condrócitos, a Osteocalcina e Osteopontina para a diferenciação em osteócitos e FABP4, PPARγ e LPL para a diferenciação em adipócitos. Com relação a diferenciação neuronal foram analisadas a expressão dos genes Nestina, beta III tubulina, Nkx6.1 e Ngn3.

**6. Microscopia de varredura a laser confocal para estudo do fenótipo celular**

Uma amostra de células foi cultivada e submetida à diferenciação neuronal sobre lamínulas de vidro tratadas com poli-L-isina. As células foram coletadas 8 dias após o tratamento, e fixadas com paraformaldeído em tampão fosfato por 15 min na temperatura ambiente e lavadas em PBS. Os anticorpos primários foram incubados por 18 h a 4° C em solução PBS contendo Triton X-100 e leite desnatado. Após a incubação com anticorpos primários, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugados com fluoresceína ou rodamina por 2 horas à temperatura ambiente, as lamínulas foram montadas e avaliadas em microscópio confocal. Os anticorpos primários que foram utilizados são: anti-nestina (IgG policlonal de cabra); beta III tubulina (IgG monoclonal de camundongo); anti-sinaptofisina (IgG policlonal de coelho)

**7. Marcação para rastreamento celular in vivo**

Para rastreamento das MSC in vivo as células foram marcadas com Qdots, o Qtracker Cell Labeling Kit (Invitrogen). As células foram submetidas à ação da tripsina (Ginbco), suspensas em meio de cultura (DMEM-LG/10% SFB) e contadas. O protocolo à partir deste ponto segue o manual do produto. Sucintamente preparou-se uma solução de marcação 10mM misturando 1µl do componente A e B (Kit) à temperatura

ambiente por 5 minutos. Foi adicionado 0,2ml de meio de cultura de crescimento (DMEM-LG/10% SFB) e misturado sob agitação vigorosa por 30 segundos. A solução contendo  $1 \times 10^6$  células foi adicionada à solução de marcação, sendo levemente agitada a cada 5 a 10 minutos e incubada a 37°C por 45-60 minutos. Após esse período as células foram lavadas duas vezes com meio de cultura de crescimento e submetidas a teste in vitro de permanência da marcação, durante as gerações posteriores ou foram lavadas com PBS para posteriormente serem injetadas no animal.

### ANIMAIS

Foram utilizados 12 coelhos fêmeas, com idade entre 2 e 4 meses, da raça Nova Zelândia, pesando entre 800 e 1900 gramas (média de 1135,60 gramas), provenientes da Granja RG. Antes de serem incluídos no estudo, todos os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura constante (21°C). Os animais apresentaram estado geral de saúde bom, livres de ecto e endoparasitas. Os procedimentos cirúrgicos no Núcleo de Medicina Experimental foram realizados após a constatação do perfeito estado de saúde dos coelhos, de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e as normas para o uso de animais em experimentos científicos estipuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo desse estudo foi submetido ao Conselho de Ética do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e já aprovado sob o protocolo CEEA IB 15891. Todas as coelhas foram pesadas e em seguida colocadas em gaiolas individuais, marcadas com um número de identificação (11 a 22). Para a identificação específica de cada animal foi utilizada caneta hidrográfica, inscrevendo-se nas duas orelhas o mesmo número da gaiola correspondente. As coelhas de 11-16 foram incluídas no lote A e de 17-22 no lote B. A seguir as coelhas foram anestesiadas com uma mistura de Cetamina na dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup> e de "Rompun" na dose de 5 mg.kg<sup>-1</sup>, aplicada por via intramuscular. A anestesia tópica foi realizada instilando-se tetracaína a 0.5% (1 gota/olho), após a irrigação dos olhos com solução de cloreto de sódio 0.9%.

Neste estudo duplo cego, no qual o operador desconhecia o tipo de solução empregada para o tratamento, as soluções de álcool absoluto e SF foi previamente preparada em seringa de 10 ml, por um profissional que não participou dos procedimentos cirúrgicos e nem das análises laboratoriais. As duas soluções (SF e de álcool) foram aspiradas aleatoriamente, em seringas iguais e identificadas com os numerais 1 e 2. Para o experimento, 1 ml da solução da seringa 1 foi aplicada no olho direito e 1 ml de solução da seringa 2 no olho esquerdo na área retrobulbar de cada animal dos dois lotes. No 15º dia, nos dois olhos dos coelhos do lote A, na região retrobulbar foi feita a aplicação da solução contendo 1ml células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MSC) marcadas com quantum dots (Qdots). Os animais do lote B receberam solução de 1ml de PBS nos dois olhos também na região retrobulbar.

Após 15 dias da aplicação retrobulbar de MSC ou PBS, os animais foram então sacrificados e cada nervo óptico foi fixado para análise em laboratório. As análises das lâminas foram executadas sem o conhecimento prévio do procedimento cirúrgico e de qual lote de animais provinha o material de estudo.

### INJEÇÃO RETROBULBAR

Uma anestesia complementar tópica com colírio cloridrato de tetracaína 1% (Allergan), 1 gota em cada olho foi aplicada

após sedação dos animais. As pupilas foram dilatadas com 1 gota em cada olho de colírio ciclopentolato 1% (Allergan). Após a colocação do blefarostato, foi realizada uma incisão com tesoura de Wescott de 2mm na conjuntiva superior a 3mm do limbo para permitir acesso à região retrobulbar. Pela incisão uma cânula curva, com ponta romba foi inserida no espaço tenoniano. A identificação escleral realizada com a ponta da cânula foi monitorada oftalmoscópicamente com aparelho oftalmoscópio indireto, até atingir a borda papilar do disco óptico. A injeção da solução preconizada (no 1º dia 1 ml de SF ou de álcool e no 15º dia de solução contendo células-tronco ou PBS) foi então efetuada no espaço retrobulbar.

### AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

As avaliações clínicas dos olhos dos animais foram realizadas mediante utilização de lâmpada de fenda (haag straight) e estímulo luminoso com lanterna direcionada diretamente para cada pupila visando analisar a motilidade pupilar, antes dos procedimentos via retrobulbar e no 1º, 7º e 15º dias após a aplicação retrobulbar de cada olho dos animais. Observou-se hiperemia conjuntival classificando-se como leve, moderada ou intensa, presença ou não de secreção ocular e reflexo pupilar.

### SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Após 15 dias da aplicação retrobulbar de MSC ou PBS e imediatamente após o exame macroscópico de controle, os animais receberam uma dose letal de tiopental a 3% (25 mg/kg de peso vivo), injetada na veia marginal da orelha. Imediatamente após o sacrifício do animal, os tecidos foram ressecados a partir de uma enucleação do globo ocular. Com lâmina de bisturi nº 23 o nervo óptico foi extirpado e conservado em formalina tamponada a 10%. Todos os frascos foram identificados para posterior inclusão do material em parafina.

### PROCESSAMENTO DAS LÂMINAS

Os tecidos fixados em formalina tamponada a 10% foram processados em parafina e arquivados no Laboratório de Hematologia e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas. Foram confeccionados blocos de tecido parafinado e recortados transversalmente em espessura de 12 µm. As lâminas confeccionadas foram analisadas e fotografadas conforme processamento descrito a seguir:

### MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO

Os nervos ópticos conservados em formalina tamponada a 10%, foram transferidos para um tubo com solução de 5ml de água destilada e sacarose 10% e mantidos por 24hs, até a saturação do tecido. Os nervos ópticos foram então imersos em solução contendo sacarose 20% por mais 24 horas e fixados em parafina a seguir.

### CONFECÇÕES DAS LÂMINAS

Os cortes dos tecidos foram realizados no sentido transversal ao nervo óptico respeitando-se a espessura de 12 µm. Utilizou-se o aparelho de criostato do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas. Os cortes foram aplicados na lâmina previamente silanizada (aproximadamente 5 cortes por lâmina) até a total extinção do tecido. A seguir as lâminas foram analisadas e fotografadas utilizando-se microscópio confocal em aumento de 10X, ganho de 854,9nm, laser 488 com intervalo da banda de emissão entre 600nm até 700nm.

## RESULTADOS

Os resultados das análises fenotípica, de estabilidade cromossômica e morfológica, das células tronco, estão descritas a seguir nas figuras 2 e 3.

As imagens dos olhos de 12 animais (24 olhos) adquiridas com microscopia óptica confocal confirmam a presença das células-tronco em 100% dos olhos dos animais do lote A que receberam células-tronco mesenquimais marcadas com Qdots e mais intensamente em todos os olhos que sofreram neuropatia óptica prévia com álcool absoluto (figura 4). As imagens de todos os controles negativos (lote B) estão demonstradas na figura 5.

Avaliação clínica dos animais: após a lesão do nervo óptico com álcool absoluto, todos os coelhos apresentaram hiperemia conjuntival leve, presença de secreção amarelada em pequena quantidade. Durante o estímulo luminoso foi observado midríase parálitica em todos os olhos esquerdos dos lotes A e B. O coelho número 12 (lote A) apresentou dificuldade na locomoção e instabilidade de equilíbrio. A hiperemia ocular observada nos olhos dos animais desapareceu progressivamente durante os 15 dias após a aplicação de álcool absoluto. Após a infusão de MSC todos os coelhos tinham uma discreta reversão dos sintomas de hiperemia, melhora motilidade física e apresentaram fotofobia e miose ao estímulo luminoso nos olhos que antes apresentavam midríase parálitica. A figura 6 demonstra o modo de pesquisa de sensibilidade à luz e miose em um dos olhos do coelho 11. Este método foi utilizado em todos os olhos dos coelhos conforme descrito na metodologia deste estudo.

## DISCUSSÃO

No Brasil, a ocorrência de casos de cegueira foi estimada em 0,4 a 0,5% da população, ou seja, de 4 a 5 mil pessoas por milhão de habitantes. Considerando que no ano 2000 a população brasileira era de 160 milhões de habitantes, o número de indivíduos cegos nos próximos anos será muito maior do que os 640.000 avaliados naquele ano.<sup>(2,4,30,31)</sup>

Embora, na última década, as pesquisas com MSC tenham trazido avanços significativos aplicáveis na terapia celular, ainda não há consenso quanto a alguns aspectos como: qual o marcador celular ideal, a via de administração, a preferência por determinado tipo celular, entre outros.

No presente estudo, na fase de acompanhamento pós-lesão do nervo óptico, buscou-se monitorar o comportamento das MSC originárias de tecido adiposo que foram aplicadas no espaço retrobulbar. A detecção da presença e da permanência das MSC no tecido lesado tornou-se possível em função da marcação prévia das células com Qdots. Os Qdots são nanopartículas fluorescentes, semicondutoras, adotadas mais recentemente para a obtenção de bioimagens nos estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Dentre outras propriedades, como fotoestabilidade e luminescência, apresentam boa resistência à degradação química ou metabólica e mínimos efeitos citotóxicos.

Os efeitos citotóxicos são dose dependentes e podem ser atenuados com o uso de baixas dosagens destas nanopartículas.<sup>(32)</sup> Muller-Borer e colaboradores<sup>(32)</sup> que usaram um modelo de co-cultura, durante a análise das imagens confocais, observaram que o número de células marcadas com Qdots não se altera, substancialmente, 72hs após a marcação. Por isso recomendaram que, tanto nos estudos *in vitro* como *in vivo*, o transplante das MSC marcadas com Qdots deve ser efetuado até 24 horas após

a marcação. Atualmente outros métodos para monitorização de células tronco estão sendo estudados. Assim, as MSC poderão ser monitoradas facilmente após o enxerto e diferenciação em células do hospedeiro.<sup>(33,34)</sup>

No presente estudo a marcação com Qdots permitiu confirmar a presença e a distribuição das MSC ao redor do nervo ótico nas lâminas obtidas após 15 dias da aplicação. O período de 15 dias para a monitorização das MSC foi adotado em função dos experimentos de Harting et al.<sup>(14,35)</sup> que avaliaram o comportamento de MSC e de células progenitoras usadas para o tratamento de lesão cerebral traumática, em ratos. Nos relatos de Harting e colaboradores<sup>(14)</sup> que utilizaram a via endovenosa para a aplicação das MSC, aproximadamente 50% das células que foram detectadas nos cérebros dos ratos, estavam presentes na área lesada ou na área de penumbra, ou seja, próximos da área lesionada. Estas células representaram uma pequena fração daquelas que haviam sido aplicadas inicialmente. Os autores relataram que cerca de 48 horas após a infusão das MSC a maioria das células permaneciam no pulmão. Aproximadamente, cerca de 1,5% a 3,7% das células infundidas conseguiu atravessar o pulmão e alcançar a circulação arterial. Somente cerca de 0,295% alcançaram a artéria carótida e uma quantidade muito pequena (0,0005%) atingiu e permaneceu no parênquima cerebral. Relataram também que na avaliação feita após duas semanas da aplicação o número de células que ainda permaneciam no cérebro dos animais era muito pequeno, menor do que na avaliação inicial.

A via endovenosa para o transplante de MSC apresenta o grande inconveniente da diminuição significativa da população de MSC transplantadas que alcançam seu local de ação, em função da retenção de células ao longo da circulação sistêmica, sendo o pulmão a principal barreira.<sup>(36)</sup>

Justifica-se a busca de outras vias de administração mais eficientes, que possam prescindir da circulação sistêmica. Harting e colaboradores<sup>(35)</sup> que aplicaram as MSC diretamente no tecido cerebral, relataram que na avaliação efetuada 2 dias após a aplicação, quase todas as células transplantadas localizavam-se ao redor do local da injeção. No entanto, na análise efetuada após 2 semanas já havia dispersão das células transplantadas.

No presente estudo, optou-se pela via retrobulbar e na análise das lâminas correspondentes aos 15 dias após a aplicação das MSC constatou-se que havia quantidade significativa de células distribuídas na área de penumbra, ou seja, ao redor da área lesionada do nervo óptico e em seu interior, um comportamento semelhante ao relatado por Harting e colaboradores,<sup>(35)</sup> quanto à distribuição de MSC no tecido cerebral.

É importante destacar que havia MSC no interior do nervo óptico, em número significativo (figura 4). Uma provável explicação é que a aplicação no espaço retrobulbar possibilita que a quase totalidade das células aplicadas alcance o seu local de ação.

A presença, em quantidade significativa, das MSC nas áreas mais centrais do nervo óptico sugere também, que quando depositadas proximamente as áreas vascularizadas peri-neurais, essas células acessam mais facilmente a porção mais interna do nervo óptico (artéria central da retina) fator que representa uma segunda vantagem da técnica de aplicação no espaço retrobulbar.

Na avaliação aos 15 dias, chamou à atenção a presença de MSC nos olhos dos animais do grupo A que receberam soro fisiológico (figura 4). Este achado pode ser atribuído à eventual agressão local provocada pela aplicação da solução fisiológica no espaço retrobulbar. A permanência das MSC no entorno do local da aplicação pode significar que a resposta inflamatória à

agressão direcionou a migração e a permanência destas células na área lesada. Este comportamento também observado nos olhos dos animais que receberam álcool absoluto sugere ser esta a via de drenagem e de defesa natural do nervo óptico (figura 4).

A opção pelo tecido adiposo como fonte de MSC foi norteada pela facilidade de obtenção em quantidades significativas tendo em vista a frequência com que são realizados os procedimentos de lipoaspiração em nosso meio. Considerou-se ainda os resultados de Manzini e colaboradores(37) e de outros autores, que indicaram o tecido adiposo como uma excelente fonte de MSC.(16-19,37) O tecido lipoaspirado quando submetido ao processo de digestão resulta em uma fração vascular contendo uma população heterogênea de células derivadas do sangue (granulócitos, monócitos, linfócitos e células hemopoéticas), estroma de células adiposas, células endoteliais progenitoras, células progenitoras de pericitos, pericitos e fibroblastos, entre outras.(37)

Manzini et al.(37) compararam a habilidade e a eficácia de MSC obtidas de tecido adiposo, de cordão umbilical e de medula óssea quanto à diferenciação em células semelhantes a hepatócitos e também quanto à capacidade de regenerar o parênquima hepático quando transplantadas como células indiferenciadas. Os autores concluíram que o tecido adiposo é uma excelente fonte de MSC e que quando obtidas de tecido adiposo podem ser consideradas como células de escolha para a terapia regenerativa do tecido hepático. No presente estudo, foram adotados a mesma fonte e o método de preparo para a obtenção das MSC.

A capacidade de proliferação das MSC, além das propriedades imunomoduladoras e plasticidade, sua capacidade em diferenciar na linhagem mesodérmica, assim como em outras células como mioblastos, cardiomiocitos, células neuronais e hepatócitos, sugerem ser uma promessa para a medicina regenerativa. Devido a sua biocompatibilidade, também podem ser aplicadas durante o crescimento celular em meios de cultura.(32,38)

Um protocolo para geração de um epitélio da córnea funcional e transplantável derivado de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (iPS) foi iniciado no Japão e o primeiro transplante de córnea proveniente de células tronco pluripotentes já foi realizado com sucesso.(39)

A possibilidade de regeneração de células neuronais traz para a oftalmologia, a esperança de diminuir os índices de baixa visão na população mundial, um aspecto de grande relevância, uma vez que a cegueira é um fator limitante para qualquer ser humano.(30,31)

### CONCLUSÕES

A constatação de migração das MSC marcadas com Qdots para as porções mais internas do nervo óptico sugere a preservação da vitalidade das mesmas.

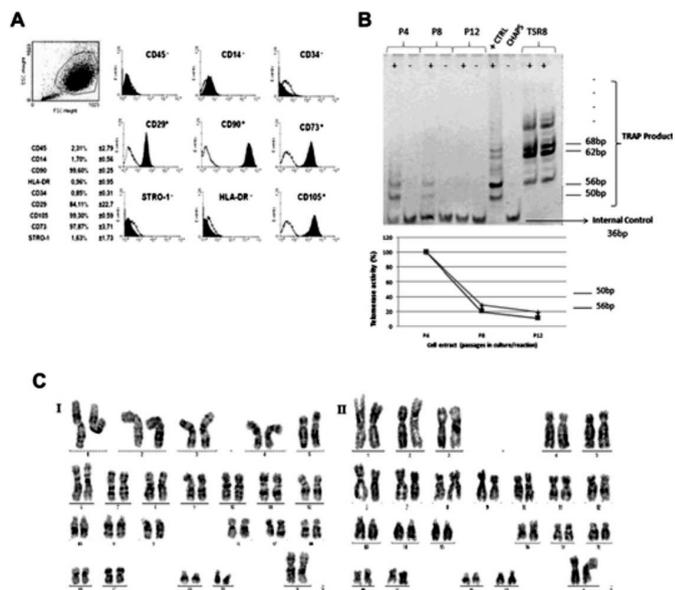
O modo de aplicação retrobulbar, permitiu que quantidades significativas de MSC atuassem localmente nas áreas lesionadas.

A proximidade das MSC com áreas vascularizadas na região peribulbar permitiu o acesso das mesmas à porção mais interna do nervo óptico (artéria central da retina), sendo esta, a provável via de acesso das MSC para todas as áreas em sofrimento.

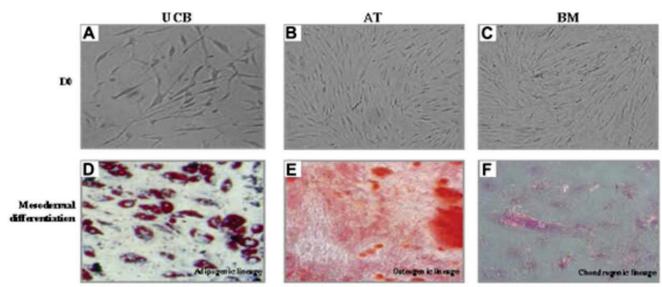
A facilidade na obtenção das células-tronco a partir do tecido adiposo, estimula a necessidade de estudos que definam a eficácia dos métodos de preservação destas células e da sua atuação nos tecidos lesados.

A permanência das MSC após 15 dias de aplicação retrobulbar na área analisada, sugere um possível indicador de vitalidade celular e atividade regeneradora do tecido neural.

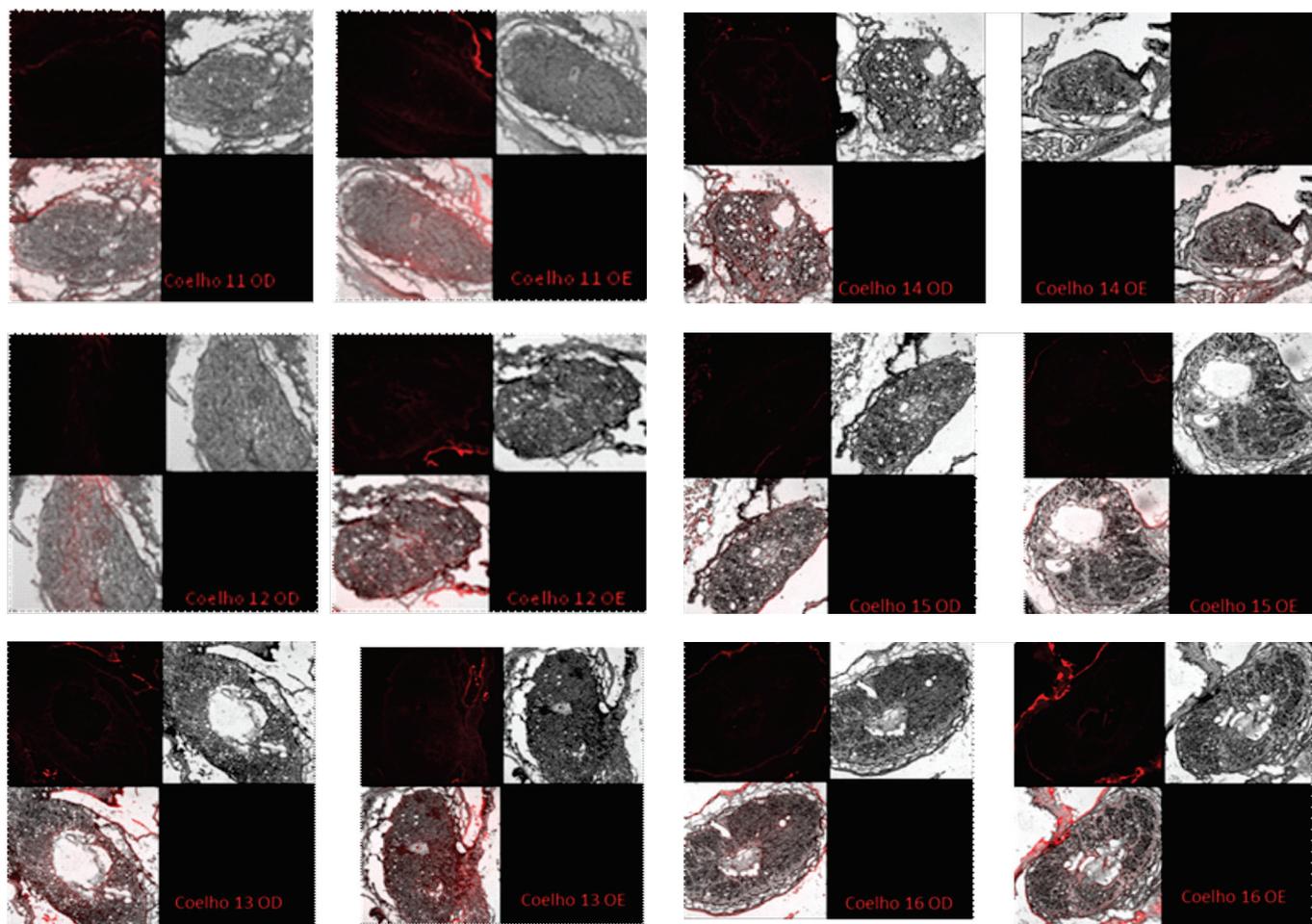
Os diferentes métodos descritos na literatura para monitorar as MSC transplantadas, aumentam consideravelmente a capacidade de compreender os mecanismos que controlam a morte de MSC, de identificar fatores tróficos e vias de aplicação que melhoram o enxerto das mesmas.



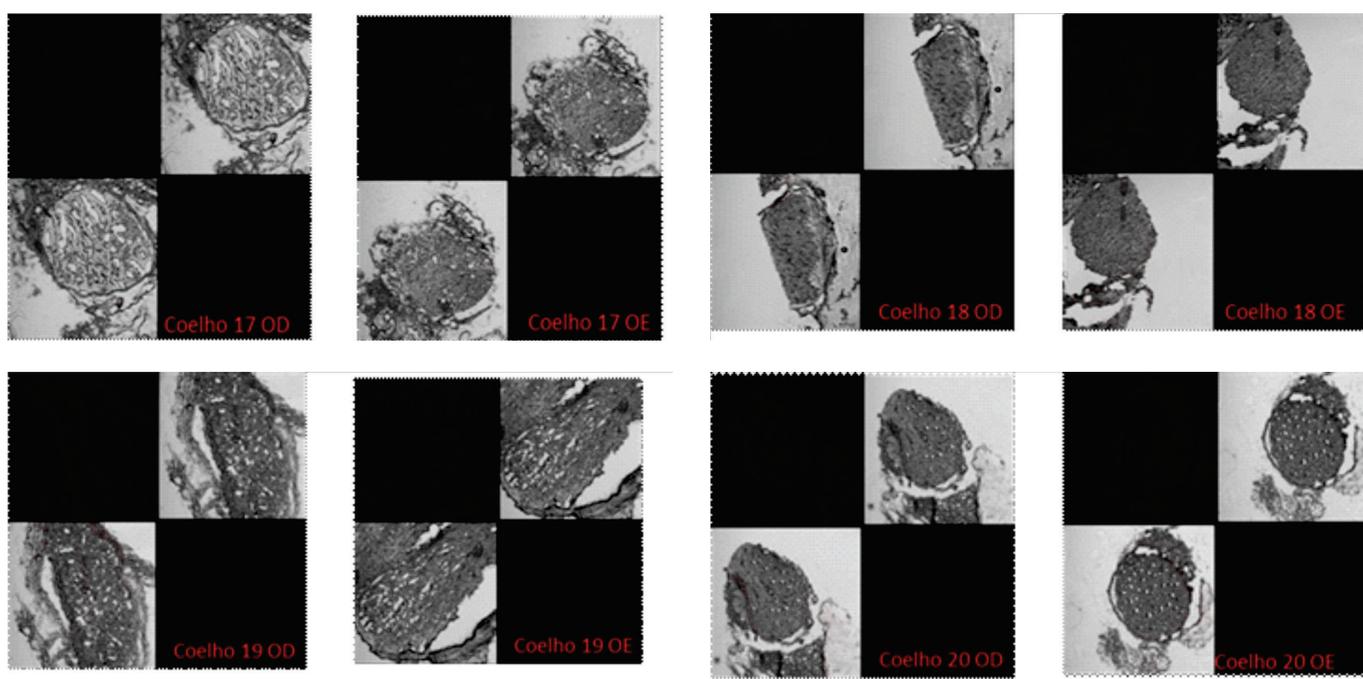
**Figura 2:** Caracterização das MSC e análise da estabilidade dos resultados genéticos. **(A):** análise de citometria de fluxo demonstrou que na 4ª passagem, 96,95% das células foram positivas para CD90, CD105, CD73 e CD29. Os demais marcadores, CD45, HLA, DR, CD34, CD14 a STRO-1, foram menores que 1% **(B):** A atividade da enzima Telomerase, foi alta na 4ª passagem, e foi diminuindo nas passagens seguintes demonstrando uma baixa capacidade de instabilidade. **(C):** (I) Análise do cariótipo das MSC na 8ª passagem; (II) Análise do cariótipo das MSC na 10ª passagem. A análise citogenética não demonstrou nenhuma anormalidade demonstrando estabilidade genética.

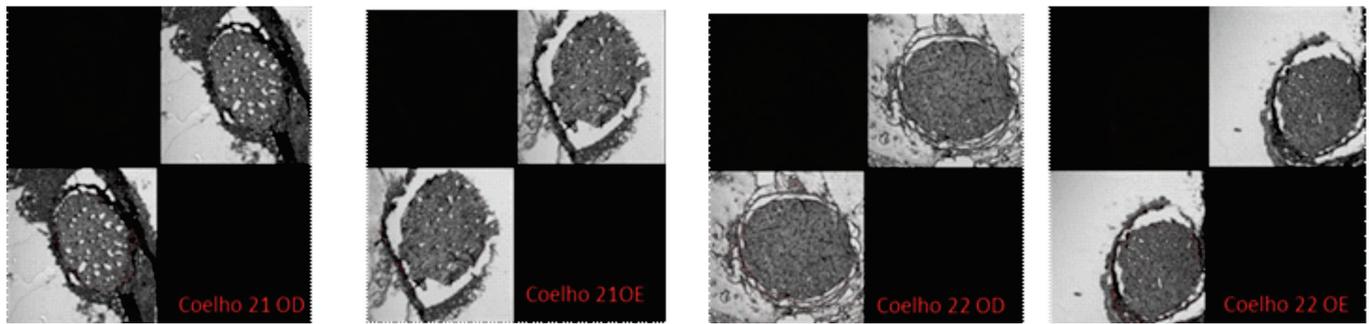


**Figura 3:** Diferenciação das MSC, da linhagem mesodérmica, diferenciação do hepatócito e análise funcional das DHLCs, armazenamento de glicogênio, absorção de ICG: **(A):** UCB, **(B):** AT e **(C):** BM e MSC indiferenciadas (U-MSCs) mostram a morfologia fibroblástica. Imagens de diferenciação das AT U-MSC em linhagem mesodérmica exemplificando as 3 diferentes fontes de diferenciação. **(D):** AT U-MSCs sofrem diferenciação para a linhagem adipogênica, confirmado pela presença de gotículas de gordura coradas com óleo vermelho. **(E):** AT U-MSCs sofrem diferenciação osteogênica confirmadas pela mineralização, armazenamento de cálcio, coradas com alizarina vermelha. **(F):** AT U-MSCs sofrem diferenciação condrogênica confirmado pela presença de condrócitos corados com sirius vermelho, resorcin e fucsina.

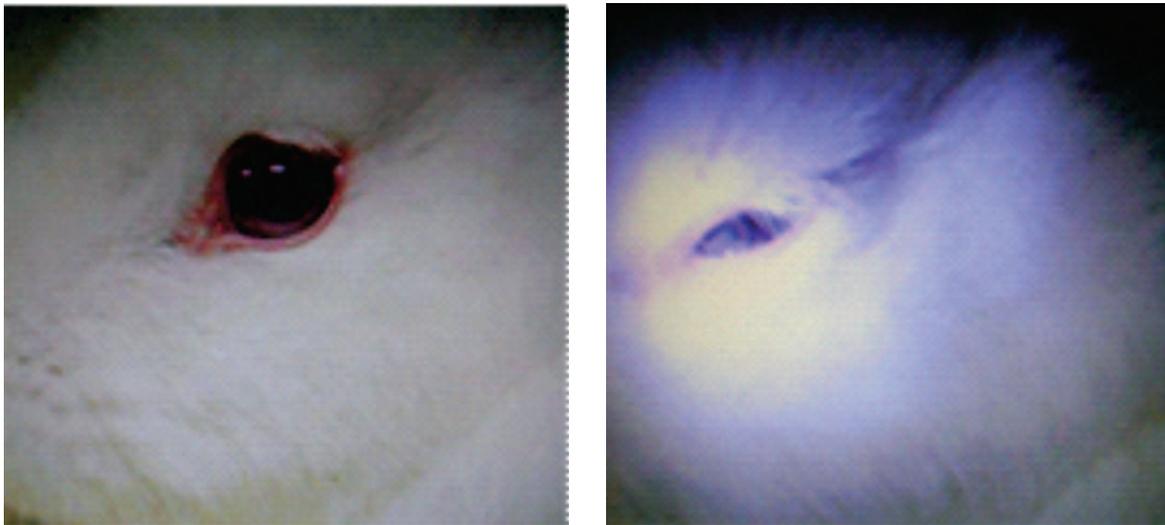


**Figura 4:** Microscopia confocal: nervo óptico do lote A. Coelhos que receberam células-tronco com Qdots. A imagem superior esquerda demonstra a presença das células-tronco registradas na cor vermelha; A imagem superior direita corresponde apenas ao nervo óptico e a imagem inferior esquerda corresponde à superposição das duas imagens superiores.





**Figura 5:** Microscopia confocal: nervo óptico do coelho do lote B que receberam PBS. A imagem superior esquerda demonstra a presença de PBS registrado na imunofluorescência; A imagem superior direita corresponde apenas ao nervo óptico e a imagem inferior esquerda corresponde à superposição das duas imagens superiores



**Figura 6:** Análise do reflexo pupilar à luz. Foto superior: OE do Coelho 11 no 15º dia após a aplicação das MSC antes do estímulo luminoso. Abaixo o mesmo olho durante o estímulo luminoso apresentando miose e fotofobia.

## REFERÊNCIAS

- Thylefors B, Négrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. *Bull World Health Organ.* 1995;73(1):115–21.
- Carvalho KM, Monteiro GB, Isaac CR, Shiroma LO, Amaral MS. Causes of low vision and use of optical aids in the elderly. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2004;59(4):157–60.
- Frick KD, Foster A. The magnitude and cost of global blindness: an increasing problem that can be alleviated. *Am J Ophthalmol.* 2003;135(4):471–6.
- Kara Jose N, Arieta CL. South american programme: Brazil. *Community Eye Health.* 2000;13(36):55–6.
- Sergott RC. Optic nerve sheath decompression: history, techniques, and indications. *Int Ophthalmol Clin.* 1991;31(4):71–81.
- Wax MB, Barrett DA, Hart WM Jr, Custer PL. Optic nerve sheath decompression for glaucomatous optic neuropathy with normal intraocular pressure. *Arch Ophthalmol.* 1993;111(9):1219–28.
- Villain M, Sandillon F, Candon E, Muller AE, Arnould B, Privat A. Experimental model of optic nerve sheath fenestration. Histology, ultrastructure, and glial immunocytochemistry. *Orbit.* 1995;14(3):113–22.
- Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol.* 1996;80(5):389–93.
- Wilensky JT. The role of brimonidine in the treatment of open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1996;41 Suppl 1:S3–7.
- Costa VP, Almeida GV, Kara-Jose N. Prevenção da cegueira por glaucoma. *Arq Bras Oftalmol.* 1998;61(3):356–60.
- Hipp J, Atala A. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2004;1(1):3–10.
- Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5):935–44.
- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(2):61–74.
- Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2009;110(6):1189–97.
- Ghosh F, Bruun A, Ehinger B. Immunohistochemical markers in full-thickness embryonic rabbit retinal transplants. *Ophthalmic Res.* 1999;31(1):5–15.
- Chang CF, Hsu KH, Chiou SH, Ho LL, Fu YS, Hung SC. Fibronectin and pellet suspension culture promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86(4):1097–105.
- Chiu RC. Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev.* 2003;8(3):247–51.

18. Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica*. 2007;92(7):872–7.
19. Bashir Q, Robinson SN, de Lima MJ, Parmar S, Shpall E. Umbilical cord blood transplantation. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010;8(11):786–801.
20. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galié M, Sbarbati A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(5):909–16.
21. Greco SJ, Zhou C, Ye JH, Rameshwar P. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(5):811–26.
22. Weir C, Morel-Kopp MC, Gill A, Tinworth K, Ladd L, Hunyor SN, et al. Mesenchymal stem cells: isolation, characterisation and in vivo fluorescent dye tracking. *Heart Lung Circ*. 2008;17(5):395–403.
23. Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, et al. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*. 2008;275(6):1260–73.
24. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739–49.
25. Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007;92(9):1208–15.
26. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290(5497):1775–9.
27. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290(5497):1779–82.
28. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(8):4080–5.
29. Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia*. 2001;35(1):26–34.
30. Marigo FA, Cronemberger S, Calixto N. Neuroproteção: situação atual no glaucoma. *Arq Bras Oftalmol*. 2001;64(2):167–71.
31. Resnikoff S, Pararajasegaram R. Blindness prevention programmes: past, present, and future. *Bull World Health Organ*. 2001;79(3):222–6.
32. Muller-Borer BJ, Collins MC, Gunst PR, Cascio WE, Kypson AP. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnology*. 2007;5(1):9–9.
33. Melo BA, Luzo AC, Lana JF, Santana MH. Centrifugation Conditions in the L-PRP Preparation Affect Soluble Factors Release and Mesenchymal Stem Cell Proliferation in Fibrin Nanofibers. *Molecules*. 2019;24(15):E2729.
34. Duran M, Luzo AC, de Souza JG, Favaro WJ, Garcia P, Duran N. Graphene Oxide as Scaffolds for Stem Cells: an Overview. *Curr Mol Med*. 2017;17(9):619–26.
35. Harting MT, Sloan LE, Jimenez F, Baumgartner J, Cox CS Jr. Subacute neural stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Surg Res*. 2009;153(2):188–94.
36. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. 2009;18(5):683–92.
37. Manzini BM, da Silva Santos Duarte A, Sankaramanivel S, Ramos AL, Latuf-Filho P, Escanhoela C, et al. Useful properties of undifferentiated mesenchymal stromal cells and adipose tissue as the source in liver-regenerative therapy studied in an animal model of severe acute fulminant hepatitis. *Cytotherapy*. 2015;17(8):1052–65.
38. Lin S, Xie X, Patel MR, Yang YH, Li Z, Cao F, et al. Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*. 2007;7(1):67.
39. Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, et al. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc*. 2017;12(4):683–96.elderly. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004;59(4):157–60.

---

**Autor correspondente:**

Clinica Potério

Rua Duque de Caxias, 780 - conj 91- Centro - Campinas - SP - Brazil

Fone: (19) 32328259 / (19) 996033396

E-mail: poterioma@hotmail.com