

Um modelo murino para tratamento de lesão por isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos com o uso de células-tronco adiposo-derivadas

ANDRÉ VICENTE BIGOLIN¹
ANTONIO FRANCISCO RUARO FILHO²
THIAGO DOS SANTOS PEREIRA²
LUCIANA LIMA MARTINS COSTA³
BRUNO BELLAGAMBA⁴
MELISSA CAMASSOLA⁵
NANCE NARDI⁶

RESUMO

A aplicação de células-tronco em retalhos cutâneos trouxe novas perspectivas ao campo da microcirurgia reconstrutiva. Este estudo visou desenvolver um modelo experimental para avaliar a utilização de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) em lesão por isquemia-reperfusão de retalhos cutâneos. Dez camundongos foram operados e divididos em Grupo 1 (isquemia e reperfusão) e Grupo 2 (controle). Foram avaliados temperatura, coloração e microangiografia. ADSCs foram isoladas de camundongos C57BL/6. Observou-se queda da temperatura e perda da coloração no Grupo 1, com recuperação no período de rep-

¹ Acadêmico do Curso de Medicina/ULBRA - Bolsista PROICT/ULBRA

² Acadêmico do Curso de Medicina/ULBRA

³ Acadêmico do Curso de Medicina/UFCSPA

⁴ Biólogo, mestrando em Genética e Biologia Molecular UFRGS

⁵ Professora do Curso de Medicina/ULBRA e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁶ Professora-Orientadora do Curso de Medicina/ULBRA e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (nance.nardi@ulbra.br)

erfusão. ADSC com expansão e morfologia adequada. Concluiu-se que foi possível estabelecer o modelo murino proposto.

Palavras-chave: retalhos cutâneos, microcirurgia, célula tronco, lesão de reperfusão, isquemia.

ABSTRACT

The use of stem cells on skin grafts brought new perspectives in the reconstructive microsurgery area. This study aimed to develop an experimental model to evaluate the using of adipose derivate stem cells (ADSCs) in ischemic reperfusion injury on skin grafts. Ten mice were operated and divided in: Group 1 (ischemia and reperfusion) and Group 2 (control). Temperature, color and microangiography were evaluated. ADSCs cells were isolated from C57BL/6 mice. Was observed that temperature fall and loss of color on Group 1; with recovery on the reperfusion period. ADSC have correct expansion and morphology. In conclusion, It was possible to development the murine model desired.

Keywords: tissue grafts, microsurgery, stem cell, reperfusion injury, ischemia.

INTRODUÇÃO

Considera-se que a regeneração de um tecido seja auto-limitada no que se refere à recuperação das características prévias à lesão. Assim o próprio tratamento cirúrgico reconstrutivo encontra-se em um paradigma já que pode ser fator causal ou de agravo a uma lesão (MCDOWELL, 1978; MCCARTHY, 1990). A reparação cirúrgica com garantia do restabelecimento estético e da capacidade funcional é, hoje, um objetivo mais próximo no campo da microcirurgia reconstrutiva. Quando se objetiva a confecção de retalhos cutâneos ou enxertos, a lesão isquêmica imposta pela própria técnica cirúrgica torna-se um limitante ao desfecho do tratamento. Há evidências indicando um envolvimento multifatorial na lesão dos retalhos. A reação oxidativa, a alteração do sistema do complemento e a intensificação da interação leucocitária causados pela reperfusão tecidual agravam a lesão ao tecido já isquêmico (ANDREWS et al., 2000; KHALIL; AZIZ; HALL, 2006).

Com o desenvolvimento da manipulação das células-tronco e aprofundamento no estudo de suas capacidades criou-se uma nova possibilidade de terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico. Células progenitoras endoteliais são estimuladas pela presença da lesão isquêmica. Após um curto período de tempo da injúria, estas células já se encontram no tecido acometido e sua concentração é maior quanto maior for a área de isquemia (PARK et al., 2004; KENNY et al., 1994; LI et al., 2000). As células-tronco teriam a capacidade de interferir nestes fatores e assim estimular a quebra no ciclo de lesões desencadeadas pela isquemia inicial, e entre as células-tronco adultas acredita-se que as células-tronco mesenquimais são as que apresentam maior potencial terapêutico (MEIRELLES; NARDI, 2009). O papel das células-tronco no aumento da viabilidade de retalhos cutâneos após períodos de lesão isquêmica está vinculado à melhoria do aporte sanguíneo. Contudo, o mecanismo pelo qual ocorre essa intensificação na formação de novos vasos ainda está por ser definido. Além da angiogênese,

sugere-se que a estimulação da secreção de fatores tróficos e de citocinas protetoras esteja associada à atenuação da injúria causada pela isquemia-reperusão (MORTAZAVI-HAGHIGHAT et al., 2002; UYSAL et al., 2009).

Nesta situação, estudos buscam novas respostas com o uso de modelos experimentais de retalhos cutâneos com ou sem indução de lesão por isquemia-reperusão (SCHOLZ; EVANS, 2008; UYSAL et al., 2009; MOON et al., 2008; LU et al., 2008; ICHIOKA et al., 2004). Apesar de terem sido descritos resultados significativos com o tratamento com células-tronco nestes modelos, a avaliação da eficácia e a padronização dos modelos ainda não foram completadas. Sendo assim este estudo visa o estabelecimento e avaliação de um modelo murino de isquemia e reperusão de retalhos cutâneos para estudo do potencial terapêutico de células-tronco.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido junto ao Laboratório de Células-Tronco e Terapia Gênica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) e realizado com o apoio do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para avaliação do modelo de isquemia e reperusão, foram desenvolvidos parâmetros de avaliação, como temperatura aferida por termômetro infravermelho (Infrared Thermometer Minipa® MT-350), coloração do retalho e microangiografia.

Animais

Modelos murinos das linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6 foram utilizados, sendo os pri-

meiros empregados na realização do experimento e os segundos para isolamento das células-tronco. Neste estudo optou-se pela utilização de células-tronco adiposo derivadas (ADSCs).

Procedimento Cirúrgico

Um grupo de 10 camundongos adultos da linhagem BALB/c foi dividido igualmente nos grupos especificados a seguir:

Grupo 1: Submetido a lesão de isquemia e reperusão.

Grupo 2: Controle, sem lesão isquêmica induzida.

A técnica operatória descrita a seguir foi aplicada em ambos os grupos, distinguindo-se apenas quanto à indução de isquemia no Grupo 1.

Os animais foram anestesiados com uso de uma mistura de 1mL de Xilasina associada a 1 mL de Ketamina e 8 mL de solução fisiológica a 0,9%. Uma dose de 0,1 mL/10g foi injetada por via intraperitoneal. Após estabelecimento de plano anestésico cirúrgico, foi realizada uma tricotomia abrangendo o lado direito do dorso do animal e a área do retalho, com 3 cm de comprimento e 1 cm de largura, foi demarcada conforme demonstra a Figura 1. Um retalho cutâneo de base cranial foi confeccionado com incisão por bisturi de lâmina 16, foi observada a integridade da pele e a separação completa do tecido subcutâneo por dissecação romba. Neste momento, apenas para o Grupo 1, foi realizada a ligadura da base do retalho através da amarração com fio de sutura (Figura 2). O leito do retalho foi fechado com pontos simples de Mononylon 4.0. Um período de avaliação de 10 minutos foi realizado e após este, para o Grupo 1,

houve a liberação da ligadura da base do retalho. Durante mais 2 minutos, período de reperfusão, os animais permaneceram em avaliação.

A seguir, uma laparotomia mediana foi realizada e por abordagem trans-diafragmática, o meio contrastado foi injetado no ventrículo esquerdo do animal.

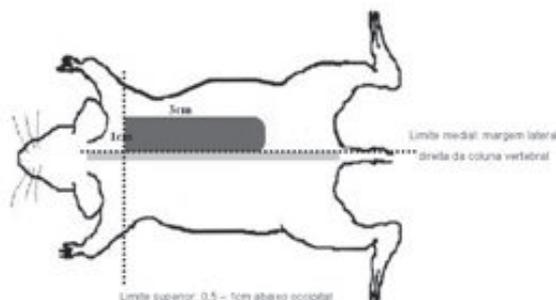


Figura 1 - Retalho cutâneo de base cranial.

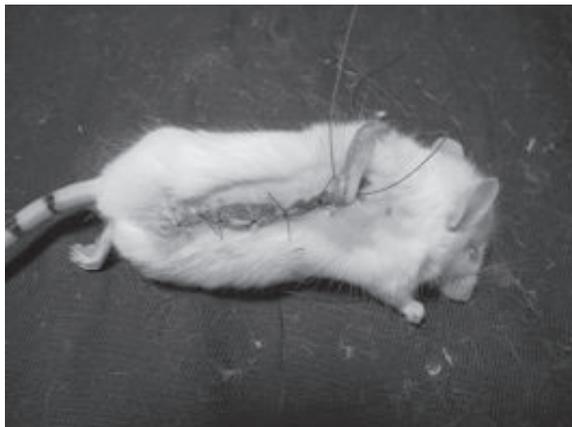


Figura 2 - Ligadura da base do retalho através da amarração com fio de sutura. Observa-se também a síntese do leito vascular.

Procedimento Radiológico

Com objetivo de confeccionar uma microangiografia dos capilares da derme, foi realizada a

injeção intracardíaca de dois meios de contraste. O primeiro meio foi baritado (Sulfato de Bário 30%) e o segundo iodado (Diatrizoato de Meglumina 60%), sendo cada um destes utilizado em 2 animais de cada grupo. Após injeção do contraste o retalho foi ressecado, observando-se uma margem de 2 cm.

As radiografias foram realizadas com a proximidade máxima entre a peça e o filme radiológico. A onda radiológica emitida foi formada por 36 kVp e 32 mAs e a impressão realizada em filme ECRAM-mamográfico Mir-2000 Kodak

Isolamento e Cultura das Células

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram utilizados para isolamento. Através de uma inguilotomia um patch de gordura foi obtido, sendo utilizada a técnica de isolamento de ADSCs com a enzima colagenase (MEIRELLES; NARDI, 2009). As células foram mantidas em cultura com meio HDMEM.

Avaliação dos Resultados

A temperatura do retalho foi aferida por um termômetro infravermelho nos terços distal e médio do retalho. Devido ao termômetro utilizado ter um campo de visão de 100 mm de diâmetro a 1000 mm de distância, observou-se uma distância termômetro-retalho de 5 cm, o que confere a cobertura de uma área de 5 mm de diâmetro pelo raio infravermelho. A aferição da temperatura nos dois pontos acima citados foi realizada a cada 2 min e 30 seg até 10 minutos, onde no Grupo 1 foi liberada a isquemia e no Grupo 2 encerrado o acompanhamento. A última aferição foi realizada para o grupo experimental no 12º minuto de avaliação (Figura 3).

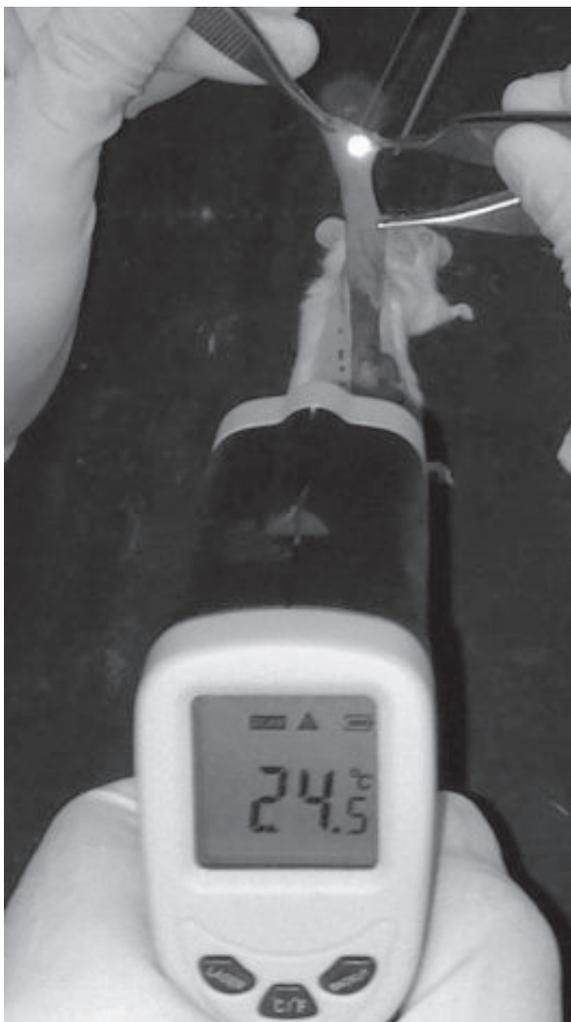


Figura 3 - Aferição da temperatura com termômetro infravermelho no terço distal do retalho.

Fotografias foram obtidas por câmera fotográfica digital no 10^o minuto de avaliação. Estas imagens foram observadas quanto a sua coloração por técnicos não vinculados ao estudo e cegos quanto ao grupo e objetivos do estudo.

A radiografia foi submetida a avaliação por médico radiologista quanto à qualidade do exame envolvendo o uso dos diferentes meios contrastados e contagem dos vasos sanguíneos segundo proposto por Hoang et al. (2005).

Quanto ao cultivo das células, observou-se sua taxa de expansão assim como análise da morfologia.

RESULTADOS

Não foram observadas complicações durante os procedimentos para confecção dos retalhos cutâneos. A abordagem do ventrículo esquerdo através do diafragma exigiu maior técnica e habilidade com o registro de vazamento de pequena quantidade de contraste para o mediastino em todos os casos. A média de duração dos procedimentos foi de 30,6 min, variando de 27 min a 35 min.

A temperatura cutânea pré-operatória teve média de 29,5^o C. Pode-se observar uma diminuição da temperatura na primeira aferição após a confecção do retalho com queda progressiva em direção a extremidade distal do mesmo. Nas medidas seqüenciais, observou-se queda de temperatura de forma mais intensa nos animais do Grupo 1, tanto no terço médio quanto no distal (Figura 4). Ao final do 10^o min de avaliação, constatou-se uma média de temperatura de 1,3^o C a menos para o Grupo 1 no terço distal e de menos 0,82^o C no terço médio. No 12^o min, quando nos animais do Grupo 1 foi avaliado o término do período de reperfusão, houve um aumento na temperatura do retalho de 0,95^o C no terço distal e 1,22^o C no terço médio.

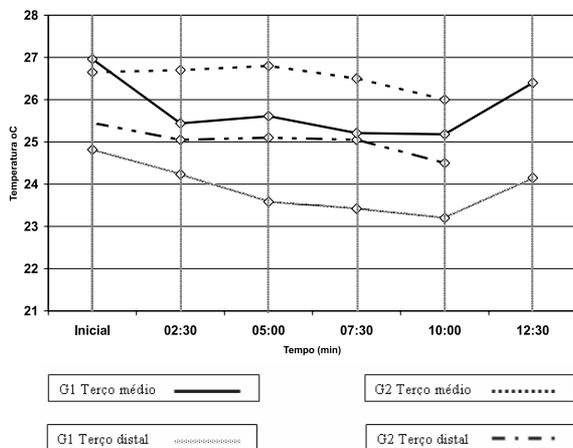


Figura 4 - Gráfico demonstrativo da alteração da temperatura nos terços médio e distal do retalho durante os diferentes períodos avaliados.

As imagens obtidas ao 10^o min de avaliação revelaram a perda mais acentuada da coloração original nos retalhos dos animais do Grupo 1, sendo observado tons mais enegrecidos e menos brilhantes nestes tecidos. Estes sinais são sugestivos de redução da perfusão tecidual (Figura 5).

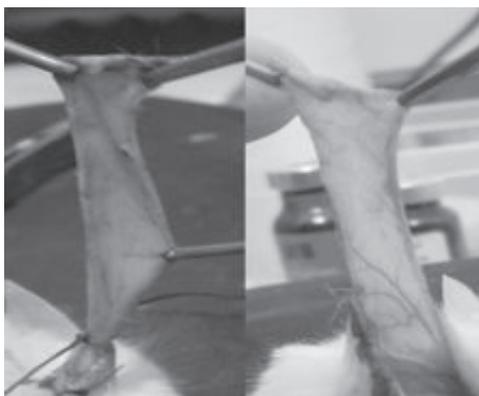


Figura 5 - Imagem fotográfica aos 10 min de acompanhamento. Observa-se sinais claros de maior alteração da coloração tecidual na imagem à esquerda, correspondente ao Grupo 1. A imagem à direita, com maior preservação de cores vivas, é referente a animal do Grupo 2.

O exame radiológico foi submetido a apreciação e considerado de qualidade/resolução insuficiente para contagem dos vasos sanguíneos. Em algumas porções do retalho pode-se observar os vasos e realizar a contagem, contudo o grande número de artefatos advindos da adesão do tecido ao filme e da umidade dos retalhos impossibilitaram uma análise angiográfica precisa. Este resultado foi observado em todos animais submetidos à angiografia, não havendo diferença entre os contrastes utilizados.

Foi possível realizar o isolamento de ADSCs de camundongos C57BL/6 através de técnica utilizando enzima colagenase. As células isoladas mostraram morfologia fibroblástica e taxa de expansão de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células *in vitro*.

DISCUSSÃO

A lesão por isquemia-reperfusão é considerada uma dificuldade no tratamento cirúrgico com retalhos cutâneos. No modelo utilizado neste estudo sendo a isquemia tecidual proporcional e progressiva em direção a parte distal à base do retalho (PARK et al., 2004). Assim pode-se observar uma diferença de temperatura entre o terço médio e o distal do retalho. Sugere-se que os maiores valores e variações de temperatura obtidos nos primeiros sejam devido a proximidade da base vascularizada.

Optou-se por não utilizar a implantação de vaso axial no retalho. Este fato pode ser a justificativa da falha na realização da microangiografia, tendo em vista que a técnica originalmente descrita foi aplicada em retalhos cutâneos vascularizados pela implantação de vaso axial. (HOANG et al., 2005). Este incremento no suporte sanguíneo impede que

a seja observado a capacidade de reabilitação das células vasculares lesadas pelo dano de isquemia-reperusão. O congelamento da peça cirúrgica antes da realização do exame radiológico, conforme idealizado pelo artigo original, pode atenuar os artefatos observados no presente estudo.

Quanto à avaliação da temperatura, optou-se pela utilização de termômetro infra-vermelho pela praticidade, baixo custo e possibilidade de avaliação rápida e repetida quando comparado à técnicas calorimétricas. Pode-se observar uma redução mais pronunciada na temperatura do retalho dos animais do Grupo 1. Após um período de 2 min e 30 seg de reperusão tecidual observou-se aumento importante da temperatura em ambos segmentos avaliados. Uma questão surge quanto a esta variação de temperatura em um período reduzido de tempo para reperusão. Moon et al. relataram que 6 períodos de reperusão de 15 seg seguidos pelo mesmo tempo de interrupção no fluxo (total de 3 min de intervenção) foram suficientes para atenuar a lesão adicional de reperusão. (MOON et al., 2008).

A maioria dos estudos avaliados mantém um período prolongado de isquemia, variando de 4 a 12 horas, seguido por um período de reperusão sem limite. (MOON et al., 2008; UYSAL et al., 2009; GIDEROGLU, 2009; KÜNTSCHER; HARTMANN; GERMANN, 2005).

Neste estudo a utilização de um fio de sutura para realizar a ligadura da base vascularizada do retalho foi capaz de reduzir a temperatura de forma importante. Observou-se redução da espessura do tecido subcutâneo próximo aos locais de contato com o fio. Diferentemente do clampamento com pinça cirúrgica mosquito, realizado por Uysal et al (2009), o fio de sutura possui uma menor área na aplicação da pressão, o que pode levar a avulsão do retalho se força excessiva for aplicada. Os resultados

importantes aqui relatados foram possíveis devido à base estreita do retalho que permitiu sua amarração. Retalhos de maiores larguras não são bons candidatos a indução de lesão isquêmica por esta técnica. Acredita-se que ambos modelos, por realizarem uma isquemia não seletiva e levarem a maceração celular de toda base do retalho, possam dificultar a recuperação pós-operatória do mesmo em relação ao grupo controle. Outros modelos de isquemia não cutânea já foram relatados, como para indução de infarto agudo do miocárdio, e demonstram ser próximo ao ideal pela seletividade e consecutivamente rigor de na comparação. (SCHOLZ; EVANS, 2008; HWANGBO et al; 2010).

É de extrema importância a síntese do leito do retalho com o objetivo de evitar a revascularização a partir do mesmo. Lu et al. (2008). realizaram a interposição do retalho com dreno de pen rouse. Esta conduta é de difícil controle da permanência do material no período de acompanhamento pós-operatório. Diferentemente do presente estudo, Ichioka et al (2004). realizaram retalhos cutâneos duplos com base cranial avascularizada. Os retalhos duplos evitariam a variação interanimal; porém, retalhos extensos no dorso dos animais podem ser mais estressantes além de acrescentarem dificuldade ao procedimento cirúrgico e assim diferença na confecção dos mesmos. Optou-se pela realização vascular cranial devido à existência de vaso sanguíneo de fácil preservação nesta localização e também para diminuir a probabilidade de auto-mutilação no pós-operatório.

A análise cega da coloração dos retalhos no 10º min pós-operatório evidenciou sinais mais intensos de isquemia no Grupo 1. A utilização de imagens fotográficas já foi utilizada por outros artigos para avaliar clinicamente a área de viabilidade do retalho. Esta avaliação pode ser realizada com períodos mais prolongados de acompanhamento

onde a necrose tecidual é mais evidente. (UYSAL et al., 2009).

O tratamento de retalhos com as ADSCs pode ser feito através da injeção das mesmas em soro fisiológico ou associadas a biomaterial (THONHOFF et al., 2008). Estas possibilidades de análise possuem significado clínico importante e reforçam a necessidade de um modelo padrão para sua comparação. O processo para obtenção das ADSCs deve respeitar rotinas e o estabelecimento de técnica padrão é importante deste o isolamento até o cultivo e utilização. Objetivou-se o cultivo de ADSCs de camundongos da linhagem C57BL/6 devido a possibilidade de utilização de linhagens transgênicas GFP para experimentos futuros. Através de imunofluorescência estas células podem ser identificadas e avaliadas quanto a sua atuação no sítio da lesão. Neste estudo as células demonstraram adequada taxa de expansão e morfologia usual. A capacidade de diferenciação deve ser avaliada em estudos subsequentes.

A limitação imposta pela isquemia ao tecido do retalho pode ser o diferencial na busca pelos resultados ideais em uma microcirurgia. Assim muitas técnicas são propostas para atenuar a lesão, seja pela indução previa de isquemia para obter maior resistência à hipoxia ou pela liberação intermitente do fluxo para amenizar a lesão de reperfusão. (MOON et al., 2008; KÜNTSCHER, HARTMANN; GERMANN, 2005). A proposta de atuação das células-tronco através de múltiplas vias para reduzir a lesão por reperfusão e ampliar o aporte sanguíneo, abre uma nova era neste campo cirúrgico. (PARK et al., 2004).

Através do proposto foi possível o desenvolvimento padronizado de um modelo murino de retalhos cutâneos para tratamento com células-tronco. Apesar da falha na angiografia os demais métodos sustentaram a confirmação da indução de isquemia-reperfusão.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, K. et al. Ischemia - reperfusion injury: A multicellular phenomenon. **Plast Reconstr Surg.**, v. 106, p. 1664–1665, 2000.

GIDEROGLU, K. et al. Montelukast protects axial pattern rat skin flaps against ischemia/reperfusion injury. **J Surg Res.**, v. 157, n. 2, p. 181-186, dec. 2008.

HOANG, N. T. et al. Proposed New Method For Angiographically Quantifying Neovascularization In Prefabricated Flaps **Inc. Microsurgery**, v. 25, p. 220–226, 2005.

ICHIOKA, S. et al. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. **Ann Plast Surg.**, v. 52, p. 414-418, 2004.

KENNY, D. et al. Transforming growth factor beta 1 preserves endothelial function after multiple brief coronary artery occlusions and reperfusion. **Am Heart J.**, v. 127, p. 1456, 1994.

KHALIL, A. A.; AZIZ, F. A.; HALL, J. C.. Reperfusion injury. **Plast Reconstr Surg.**, v. 117, p. 1024–1033, 2006.

LI, Q. F. et al. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 16, p. 45, 2000.

LU, F. et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. **Plast Reconstr Surg.**, v. 121, p. 50–58, 2008.

KÜNTSCHER, M. V.; HARTMANN, B.; GERMANN, G. Remote Ischemic Preconditioning Of Flaps: A Review. **Inc. Microsurgery**, v. 25, p. 346-352, 2005.

- MCCARTHY, J. G. Introduction. In: _____. (Edit.). **Plastic surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990.
- MCDOWELL, F. Plastic surgery in the twentieth century. **Ann Plast Surg.**, v. 1, p. 217-224, 1978.
- MEIRELLES, L. S.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Front Biosci.**, v. 1, p. 4281-4298, jan. 2009.
- MORTAZAVI-HAGHIGHAT, R. et al. Rapid and dynamic regulation of TGF-beta receptors on blood vessels and fibroblasts during ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol.**, v. 282, p. C1161–C1169, 2002.
- MOON, J. G. et al. Postconditioning Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury In Rat Skin Flap. **Inc. Microsurgery**, v. 28, p. 531–537, 2008.
- PARK, S. et al. Selective Recruitment of Endothelial Progenitor Cells to Ischemic Tissues with Increased Neovascularization. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 113, p. 284, 2004.
- SCHOLZ T.; EVANS, G. R. D. Impact of Hypertonic and Hyperoncotic Saline Solutions on Ischemia-Reperfusion Injury in Free Flaps. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 122, p. 85, 2008.
- HWANGBO, S. et al. Therapeutic Potential of Human Adipose Stem Cells in a Rat Myocardial Infarction Model. **Yonsei Med J.**, v. 51, n. 1, p. 69-76, 2010.
- THONHOFF, R. J. et al. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. **Brain Res.**, v. 2, n. 1187, p. 42-51, jan. 2008.
- UYSAL, A. C. et al. The Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Ischemia-Reperfusion Injury: Immunohistochemical and Ultrastructural Evaluation. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 124, p. 804, 2009.