

INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA MIGRAÇÃO DE GLIOMAS

ONZI, G.R.¹, MOURA, S.M.¹, WINK, M.R.¹

¹Laboratório de Biologia Celular, UFCSPA – Porto Alegre, RS

Introdução: Gliomas são tumores cerebrais caracterizados pelo alto potencial de invasão e proliferação. A soma de medidas farmacológicas e cirúrgicas não eleva a sobrevida do paciente em mais do que 14 meses, principalmente devido à alta taxa de recidiva. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias terapêuticas. Recentemente, estudos em modelos animais têm demonstrado que as células tronco mesenquimais (CTMs) apresentam um tropismo por gliomas, sendo capazes de migrar até o sítio tumoral, reduzir a taxa de crescimento do tumor e aumentar o tempo de sobrevida. O fato de essas células migrarem até o sítio tumoral faz com que sejam promissoras como transportadoras de fármacos ou de genes terapêuticos no tratamento de gliomas. Ainda não são completamente compreendidos os mecanismos responsáveis pelo tropismo das CTM, bem como as interações com as células cancerígenas que podem alterar as características do tumor. Assim, o objetivo desse trabalho é investigar se a presença das CTMs é capaz de influenciar a migração dos gliomas. A estratégia de ação para que seja atingido esse objetivo é cultivar as linhagens de glioma de rato C6 na presença do meio condicionado das células mesenquimais e então analisar a migração. A compreensão das modificações causadas pelas CTM na biologia celular dos gliomas possibilitará o seu uso adequado como ferramenta terapêutica para tratamentos futuros.

Material e Métodos:

Cultivo das linhagens celulares de CTMs e Gliomas

CTMs foram geradas e mantidas a partir do tecido adiposo de ratos Wistar adultos. As CTMs e as linhagens de glioma de rato C6 foram cultivadas em DMEM com soro fetal bovino (SFB) 10% e mantidas à 37°C e 5% de CO₂.

Diferenciação osteogênica e adipogênica: CTMs em meio de cultura suplementado

ADIPOGÊNICA
10⁻⁸ M dexametasona
2,5µg/mL insulina
100µM indometacina
3,5µM rosiglitazona



OSTEOGÊNICA
10⁻⁸ M dexametasona
5µg/mL ácido ascórbico-2-fosfato
10mM β-glicerofosfato

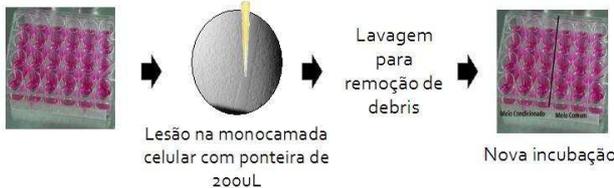
Meio condicionado (MC) de CTMs

3mL de DMEM 10% SFB + 83.000 CTMs
Após a adesão das CTMs, o meio foi trocado e fez-se o condicionamento a partir do contato com as CTM por 24 horas.
O meio foi retirado, centrifugado e filtrado. Estoques mantidos a -80°C.

O MC e os experimentos de migração e proliferação foram também realizados para as CTMs. Nos experimentos elas foram tratadas ou não com MC de C6

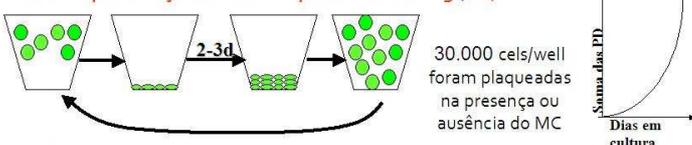
Ensaio de migração celular - Scratch-wound (Método do Risco)

Cultivo das C6 até a subconfluência (80%) em MC de CTM e em meio comum



Fotografias nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24h após o risco. Análise no ImageJ (oh = 100%)

Ensaio de proliferação celular – Population Doubling (PD)

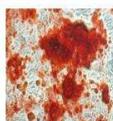


Resultados e Discussão:

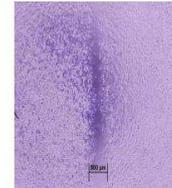
Diferenciação das CTMs em adipócitos e osteócitos (Figura 1) a partir da qual foi possível corar essas células com os respectivos corantes - Oil Red e Alizarin Red - marcando-se os vacúolos lipídicos e a matriz óssea.



Figura 1. Fotomicroscopia em aumento de 200X da diferenciação celular das CTMs. Diferenciação adipogênica à esquerda e osteogênica à direita



Ensaio de migração celular – Ensaio Scratch Wound com as células de glioma C6 em MC de CTMs



A análise foi feita em diferentes tempos: 0, 4, 8, 12 e 24 horas após feito o risco

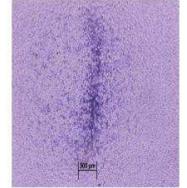


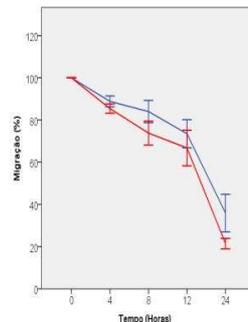
Figura 2. Fotomicroscopia (40X) do Scratch Wound de células C6 no tempo de 8 horas após o risco. À esquerda, as células controle com meio comum. À direita, as células tratadas com MC de CTMs.

Essa diferença de migração em determinados tempos, entretanto, não foi significativa. Não houve diferença na migração entre as células tratadas e não tratadas no decorrer do tempo (Gráfico 1). Os cálculos foram realizados utilizando-se ANOVA unifatorial no programa SPSS ($\alpha = 0,05$).

Ensaio Scratch Wound com as CTMs em MC de C6

A análise estatística mostrou que a presença do MC de C6 reduziu a migração das CTMs quando comparou-se os tempos nos diferentes tratamentos, com $p=0,015$ (Gráfico 2).

Scratch Wound de C6 com MC de CTM



Scratch Wound de CTM com MC de C6

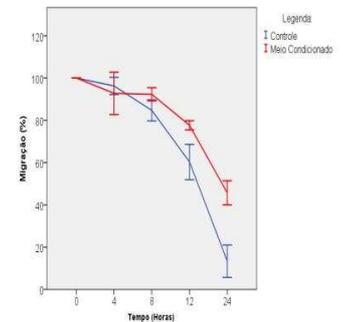
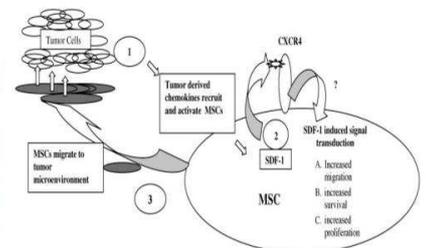


Gráfico 1. Resultado do ensaio de Scratch Wound das células C6 tratadas ou não com MC de CTMs.

Gráfico 2. Resultado do ensaio de Scratch Wound de CTMs tratadas ou não com MC de C6.

Ensaio de Population Doubling

Os ensaios de PD para as C6 tratadas ou não com MC de CTMs, bem como para as CTMs tratadas ou não com MC de C6 não apresentaram diferença significativa de proliferação celular. A partir disso, verificou-se que o MC não parece influenciar na velocidade de crescimento de uma ou outra linhagem celular. Estudos da literatura têm mostrado que o MC tumoral pode apresentar fatores que atuam nos mecanismos envolvidos na migração das CTMs, como mostrado por Menon e cols (2006):



1. Secreção de citocinas do microambiente tumoral para o recrutamento das CTM;
2. Essas citocinas vão interagir com receptores de membrana da CTM e ativar a transdução de sinal que leva ao aumento de SDF-1;
3. O SDF-1 aumentado leva a uma sinalização autócrina que pode ocasionar o aumento da sobrevivência, proliferação e migração da CTM no ambiente tumoral.

Entretanto, nos nossos estudos, nas CTMs tratadas com MC de C6 houve uma diminuição na migração. Essa diminuição, portanto, precisará ser melhor investigada a fim de se descobrir qual o mecanismo que levou a esse resultado.

Conclusão: O MC das CTMs não alterou diretamente a proliferação tumoral e nem a migração das células C6. Entretanto, o ambiente criado pelos fatores contidos no MC de C6 mostrou influenciar a migração das CTMs, reduzindo-a.