



## CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES FUNCIONAIS EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS MANTIDAS *IN VITRO* EM DIFERENTES PASSAGENS

Rafael Oliveira<sup>1</sup>

Vanessa Pinheiro Amaral<sup>2</sup>

Melissa Camassola<sup>3</sup>

### Resumo

As células-tronco mesenquimais possuem potencial clínico para reparar danos ou tecidos em diferentes patologias, incluindo defeitos osteocondrais, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas e hematopoiéticas. Porém, o cultivo celular prolongado pode induzir alterações indesejadas neste potencial de reparo das células-tronco. O presente trabalho visa comparar características de células-tronco mesenquimais entre passagens iniciais e avançadas, tanto nas células derivadas de tecido adiposo como nas de medula óssea. ASC foram isoladas a partir de tecido adiposo inguinal de ratos e BMSC foram isoladas a partir do fêmur de ratos. Ambas as células foram caracterizadas de acordo com a diferenciação osteogênica, *population doubling time* e capacidade de formação de colônia. A plasticidade osteogênica foi mensurada por meio da quantificação de fosfatase alcalina. As células de medula óssea em passagem inicial formam mais colônias que as outras células em passagem avançada. O potencial osteogênico é maior nas células de medula em passagens iniciais, efeito esse detectado por aumento nos níveis de fosfatase alcalina. Quando analisamos as duas populações de células quanto à plasticidade osteogênica, fica claro que as células obtidas de medula são as mais recomendadas para uso terapêutico em reparações ósseas. Por fim, as células-tronco mesenquimais que são mantidas em cultura precisam ser monitoradas quanto aos seus biomarcadores funcionais. Entre os biomarcadores já conhecidos os que usamos neste trabalho são ótimas alternativas: proliferação celular, capacidade formadora de colônia e plasticidade celular.

Palavras-chave: Células Estromais Mesenquimais; Diferenciação celular; Proliferação celular.

### INTRODUÇÃO

Célula-tronco é definida como um tipo celular que tem a capacidade única de diferenciação em outros tipos celulares e autorrenovação por períodos indefinidos. Isso remete ao fato de que elas podem ser expandidas *in vitro* e dados os sinais corretos de indução, uma célula multipotente pode se diferenciar em vários tipos celulares (JANUSCHKE; NATHKE, 2014).

Existem as células-tronco embrionárias (embryonic stem cell - ESC) que podem ser isoladas a partir da massa interna do embrião durante o período de blastocisto. Além da pluripotencialidade, que é uma das principais características desse tipo celular, as ESC podem formar corpos embrioides, agregados celulares que contêm as três camadas germinativas embrionárias enquanto em cultura, e podem formar teratomas *in vivo* (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000). As células-tronco multipotentes existem nos tecidos adultos. Essas células foram primeiramente isoladas de medula óssea adulta e então foram identificadas em vários

---

1 Aluno do curso de graduação em Ciências Biológicas – Bolsista PROBIC/FAPERGS -  
eurafaelmoraes@gmail.com

2 PPGBioSaúde - ULBRA – vanessap.amaral@gmail.com

3 Professor do curso de graduação em Medicina e PPGBioSaúde – melissa.camassola@ulbra.br

outros tecidos adultos. Dada sua importância médica, a identificação de células-tronco adultas tem evocado grande entusiasmo, porém elas estão presentes em baixas proporções nos tecidos adultos (JIANG et al., 2002; DA SILVA MEIRELLES et al., 2006; MARKARIAN et al., 2014).

A capacidade de isolar células-tronco de tecidos adultos foi primeiramente demonstrada em estudos no final da década de 1960, quando células estromais osteogênicas foram identificadas na medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1968). Estudos subsequentes demonstraram que essas células aderentes possuem capacidade de autorrenovação e são capazes de formar células mesenquimais, tais como adipócitos, osteoblastos, condroblastos e miócitos (PITTINGER et al., 1999). Baseados nessas propriedades, essas células são conhecidas como células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cell – MSC). As MSC podem ser cultivadas in vitro por longos períodos e cultivo celular prolongado pode induzir alterações indesejadas no potencial de reparo das células-tronco (RUBIO et al., 2005). Apesar de conhecimentos já adquiridos até o momento, ainda é necessário explorar mais os aspectos das células-tronco mesenquimais mantidas em cultura por longos períodos. O presente trabalho visa comparar características de células-tronco mesenquimais de ratos entre passagens iniciais e avançadas, tanto para células derivadas de tecido adiposo (ASC) como para células derivadas de medula óssea (BMSC).

## **METODOLOGIA**

*Animais:* Foram utilizadas células de três ratos fêmeas da linhagem Lewis com aproximadamente quatro semanas de idade. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética da FEPPS (MEMO no. 02/201, 07 de agosto de 2013).

*Isolamento e cultivo de rASCs e rBMSCs:* As ASC foram isoladas a partir de tecido adiposo inguinal conforme metodologia estabelecida anteriormente por nosso grupo (Meirelles e Nardi, 2003). As BMSC foram isoladas a partir do fêmur dos ratos de acordo com procedimento descrito por Meirelles e Nardi (2003). As células foram expandidas em cultura e denominadas células em passagens iniciais - PI (passagem 6) e avançadas -PA (passagem 40).

*Diferenciação osteogênica:* para indução da diferenciação as células ASC e BMSC foram expostas a meio específico durante 14 dias. O meio osteogênico foi composto de DMEM suplementado com 15 mM HEPES, 10% SFB (Soro Fetal Bovino),  $10^{-8}$  M dexametasona, 5 µg/mL ácido ascórbico 2-fosfato e 10 mM glicerolfosfato. As células foram coradas com Alizarin Red S durante 20 minutos para coloração da matriz resultante de cálcio.

*Population doubling time:* O tempo de duplicação da população celular (PDT – Population Doubling Time) foi calculado no programa Cell calculator – doubling time, de acordo com a seguinte fórmula:  $PDT = \text{duração} \times \log(2) / \log(\text{concentração final}) - \log(\text{concentração inicial})$ .

*Ensaio Clonogênico:* As células foram plaqueadas em uma densidade de 200 células/poço em placas de 6 poços em triplicata. Após 14 dias de incubação as células foram incubadas com álcool metílico e coradas com Giemsa para contagem de colônias em microscópio óptico invertido. Foram consideradas colônias grupamentos com mais de 50 células. O resultado do potencial de formação de colônias foi expresso pela porcentagem de colônias formadas.

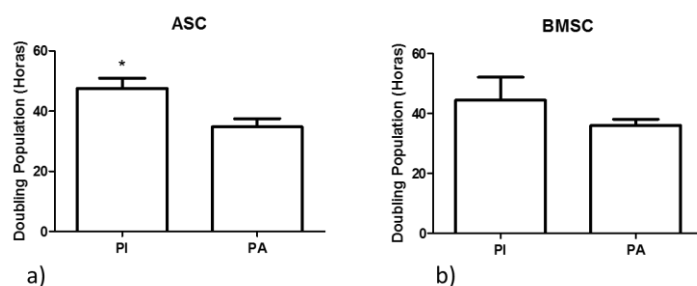
*Fosfatase Alcalina:* Após 14 dias em meio indutor de diferenciação osteogênica, as culturas foram lavadas com PBS e incubadas 2 h a 37 °C com 200 µL de substrato BCIP/NBT (Invitrogen). Após a incubação foram adicionados 200 µL de SDS/ 10% HCl e as células ficaram a 37 °C por 16 horas em ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. A densidade óptica (optical density - O.D.) foi determinada em leitor de multiplaca (Multiskan Ex original, Serial-RS-232c) a 405 nm. Os resultados foram expressos = O.D. (células diferenciadas) – O.D. (controles).

*Análise estatística:* Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. A estatística entre os grupos que sofreram diferentes tratamentos foi feita usando Teste t de Student ou ANOVA seguido de Teste de Tukey. Os resultados foram analisados e os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

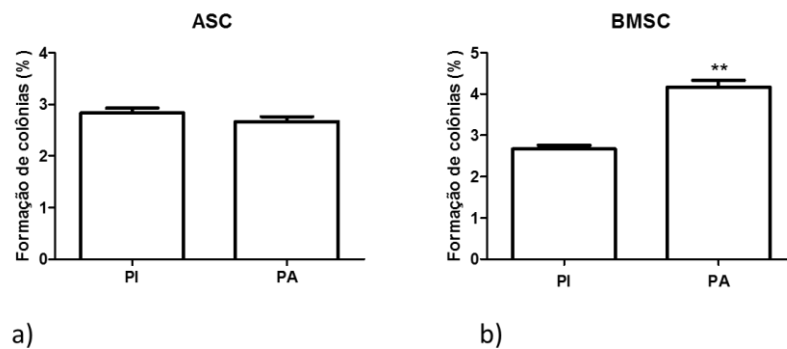
A cada repique as células foram contadas; com a obtenção do número de células possibilitou-se o acompanhamento da cultura e informações do *doubling population time* foram adquiridos (Figura 1a e b). Woodbury (2000) cultivou células do estroma de ratos adultos e foram expandidas como células indiferenciadas em cultura durante mais de 20 passagens, indicando a sua capacidade proliferativa. As células cultivadas no nosso trabalho permaneceram em cultura até a passagem 40. Nos dois tipos celulares aqui estudados, as células em passagem avançada se dividiram em menos tempo (ASC - 35 h e BMSC - 36 h) quando comparadas com as células em passagem inicial (ASC - 47 h e BMSC - 44 h). Este tempo é maior que o tempo de MSC derivada de polpa dentária humana que proliferaram em cerca de 21h em passagens baixas (KADAR et al., 2009).

Figura 1: Comparação do tempo de duplicação das células ASC e BMSC em passagem inicial (PI) e passagem avançada (PA). a) ASC. b) BMSC. Tempo de duplicação expresso em horas. \*  $p < 0,05$ , (n = 3).



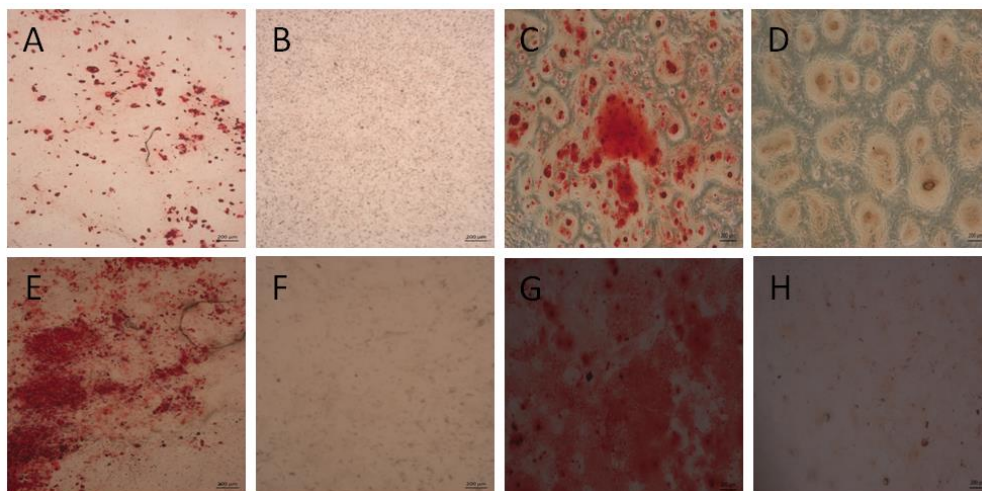
O potencial para formar colônias é um aspecto importante e distingue as células-tronco mesenquimais das outras células já diferenciadas, a capacidade de fazer mitoses simétricas (POCHAMPALLY, 2008). No nosso trabalho, aproximadamente 2,7 % das ASC e BMSC em passagem inicial tiveram capacidade para formar colônias e o mesmo foi observado nas ASC em passagem avançada. Já as BMSC em passagem avançada tiveram aumento significativo na porcentagem de células formadoras de colônias em 1,5 vezes (Figura 2a e b). Isso pode ter ocorrido devido a maior instabilidade genômica apontada pelo aumento de micronúcleos observados nessas células em nosso trabalho.

Figura 2: Comparação do potencial de formação de colônias entre passagem inicial (PI) e passagem avançada (PA). Potencial de formação de colônias expresso em porcentagem de células capazes de formar colônias. a) ASC. b) BMSC. \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ .



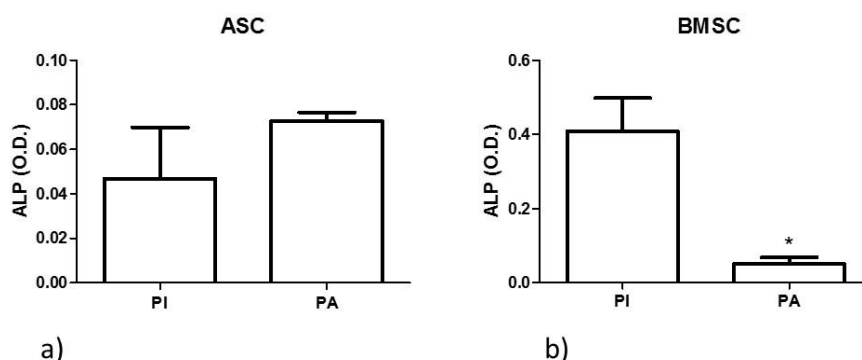
As ASC e BMSC apresentaram capacidade de diferenciação em linhagem osteogênica verificada através de coloração vermelha da matriz, tal característica é resultante do depósito de fosfato de cálcio das células diferenciadas (Figura 3). Paralelamente a estes resultados temos que BMSC de camundongos induzidas em meio osteogênico também demonstraram capacidade de diferenciação reduzida das culturas avançadas (KRETLOW et al., 2008).

Figura 3. Fotos da diferenciação osteogênica de ASCs em passagens iniciais (p6) e avançadas (p40) e BMSCs iniciais (p6) e avançadas (p40). (A) ASC avançada osteo; (B) ASC avançada controle; (C) ASC inicial osteo; (D) ASC inicial controle; (E) BMSC avançada osteo; (F) BMSC avançada controle; (G) BMSC inicial osteo; (H) BMSC inicial controle. Aumento de 500x.



Quando analisamos a atividade de ALP (Figura 4), os níveis de ALP foram mais altos em BMSC em passagem inicial em relação a passagem avançada ( $p < 0,001$ ), enquanto que não houve diferença na atividade de ALP em ASC em diferentes passagens. Esses achados reforçam o maior potencial osteogênico das BMSC em passagens iniciais e vão de acordo com o proposto por Shiratsuki et al. (2015), que observaram que BMSC são superiores.

Figura 4. Quantificação da análise indireta dos níveis de ALP em ASC e BMSC em passagem inicial (PI) e avançada (PA). a) ASC e b) BMSC.  $P < 0.05$ , (n=3).



## CONCLUSÕES

As ASC em passagem avançada dividem mais rapidamente e para os outros aspectos analisados não foi detectada diferença. As BMSC em passagem avançada formam mais colônias que BMSC em passagem inicial. O potencial osteogênico é maior nas BMSC em passagens iniciais, efeito esse detectado por aumento nos níveis de fosfatase alcalina. Portanto, tempos prolongados em cultura fazem com que as BMSC formem mais colônias, com isso o seu potencial osteogênico diminui. Quando analisamos as duas células quanto à plasticidade osteogênica, fica claro que as BMSC são as mais recomendadas para uso terapêutico em reparações ósseas. Por fim, as células-tronco mesenquimais que são mantidas em cultura precisam ser monitoradas quanto aos seus biomarcadores funcionais. Entre os biomarcadores já conhecidos, os que usamos neste trabalho são alternativas viáveis e indicadas: proliferação celular, capacidade formadora de colônia e plasticidade celular.

## REFERÊNCIAS

- JANUSCHKE, J.; NÄTHKE, I. Stem cell decisions: a twist of fate or a niche market? **Semin Cell Dev Biol**, v. 34, n.116-23, 2014.
- ITSKOVITZ-ELDOR, J. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Mol Med**, v.6, p 88-95, 2000.
- JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 6893, p.41-9, 2002.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, n.2204-13, 2006.
- MARKARIAN, C. F. et al. **Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. Biotechnol Lett**, v. 36, p693-702, 2014.
- FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, p.230-47, 1968.
- PITTERNGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.5411, p.143-7, 1999
- RUBIO, D. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer Res**, v.. 65, p.3035-9, 2005.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; NARDI, N. B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **Br J Haematol**, v. 123, n. 702-11, 2003.
- WOODBURY, D. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res**, v. 61, p. 364-70, 2000.
- KADAR, K. et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. **J Physiol Pharmacol**, v.60, p. 167-75, 2009.

KRETLOW, J. D. et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. **BMC Cell Biology**, v. 9, p.60-72, 2008.

SHIRATSUKI, S. et al. Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells. **Hepatol Res**. 2015.