



DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATO EM PASSAGENS INICIAIS E AVANÇADAS

João Pedro da Rocha Prestes¹
Vanessa Pinheiro Amaral²
Melissa Camassola³

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 no potencial de diferenciação celular das células-tronco. O presente trabalho visa comparar a plasticidade osteogênica de células-tronco mesenquimais entre passagens iniciais e avançadas, tanto nas células derivadas de tecido adiposo como nas de medula óssea. As células derivadas de tecido adiposo foram isoladas a partir de tecido adiposo inguinal de ratos e as células de medula óssea foram isoladas a partir do fêmur de ratos. A plasticidade osteogênica foi medida por meio da quantificação de matriz de cálcio corada com alizarina. Foi identificado um potencial osteogênico maior nas BMSC em passagens iniciais, efeito esse detectado por aumento nos níveis de mineralização. 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 BMSC em passagens iniciais possuem potencial osteogênico mais alto sendo as mais indicadas entre as células analisadas para uso terapêutico.

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

INTRODUÇÃO

As células-tronco são tipos celulares com 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).

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, dos tecidos adultos, foram primeiramente isoladas de medula óssea adulta e então foram identificadas em vários outros tecidos adultos (JIANG et al., 2002; DA SILVA MEIRELLES et al., 2006; MARKARIAN et al., 2014).

Os conhecimentos adquiridos até o momento demonstraram que essas células aderentes possuem capacidade de autorrenovação e são capazes de formar células de origem mesenquimal, tais como adipócitos, osteoblastos, condroblastos e miócitos (PITTINGER et

1 Aluno ULBRA São João – Bolsista PIBIC-EM/CNPq - jpedro20091@gmail.com

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

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

al., 1999). Estas 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 na sua plasticidade (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 o potencial osteogênico 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. Foram feitas trocas periódicas do meio de indução. Para a observação da diferenciação, após a o período de indução a camada de células foi lavada com tampão fosfato (PBS) e fixada com 4% de paraformaldeído durante 10 minutos. O fixador foi retirado e adicionou-se Vermelho de Alizarina S durante 20 minutos para coloração da matriz resultante de cálcio. O corante foi removido e lavado com PBS. A placa de cultivo foi visualizada em microscópio de contraste de fase. Os controles da indução de osteogênese foram células mantidas em meio HDMEM pelo mesmo período.

Análise semi-quantitativa de mineralização: Após a coloração da diferenciação osteogénica (3 e 11 dias), as células foram fixadas com 70% etanol, durante 15 minutos, e lavadas três vezes com água destilada. Vermelho de Alizarina S (126 µL) foi adicionado, em placas de 12 poços, às células e foram incubadas durante 30 min à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por quatro lavagens com água destilada. Após a última lavagem, as células foram incubadas com 500 µL de isopropanol, durante 5 min. Subsequentemente, as amostras foram distribuídas numa placa de 96 poços para a leitura espectrofotométrica (Multiskan Ex original, serial RS-232C) a 540 nm. Para a quantificação da mineralização, uma razão molar 1: 2 entre o Vermelho de Alizarina S e de cálcio foi aplicada. Os resultados foram expressos = O.D. (células diferenciadas) – O.D. (controles).

Análise estatística: Os dados foram representados em média ± 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

Após as células terem sido coradas com alizarina elas foram processadas e a alizarina foi quantificada (Figura 1). A razão utilizada foi 1:2, ou seja, cada mM de alizarina é capaz de corar 2 mM de cálcio. Os valores obtidos foram expressos em mM de cálcio corado (Figura 2). Não houve diferença na quantidade de matriz de cálcio formada pelas ASC em passagens iniciais e avançadas, porém BMSC em passagem inicial produziram maior quantidade de matriz em relação a passagem avançada ($p < 0,05$). Este resultado sugere a diminuição da capacidade de diferenciação osteogênica das BMSC mantidas até passagens altas. A partir desses resultados também podemos observar que as BMSC apresentam mais matriz de cálcio que as ASC. Isso indica que as BMSC têm maior potencial de diferenciação osteogênica que ASC, pois segundo Zhang et al. (2009) a origem anatômica das MSC tem uma profunda influência no seu potencial de diferenciação.

Figura 1: 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.

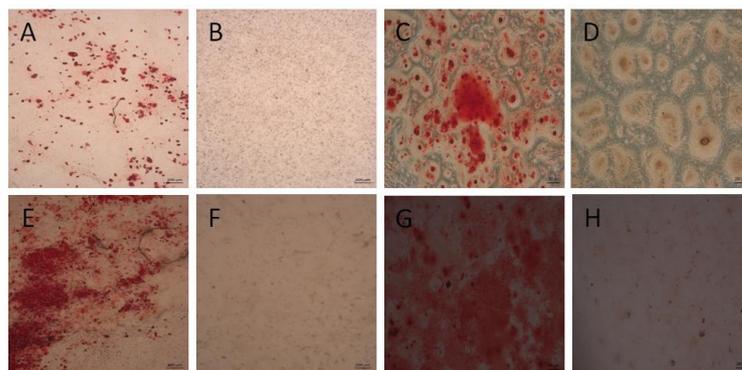
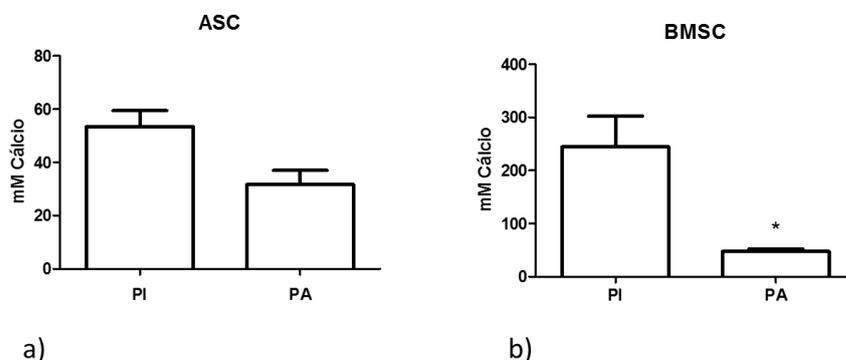


Figura 2: Quantificação da matriz de cálcio mineralizada expressa em mM nas ASC e BMSC após manutenção em meio indutor por 14 dias. PI: passagem inicial e PA: passagem avançada. $*p < 0,05$, $n=3$.



CONCLUSÕES

O potencial osteogênico é maior nas BMSC em passagens iniciais, efeito esse detectado por aumento nos níveis de mineralização. Portanto, tempos prolongados em cultura fazem com que as BMSC tenham o seu potencial osteogênico diminuído. Quando analisamos as duas células quanto à plasticidade osteogênica, fica claro que as BMSC são as mais recomendadas para uso terapêutico em reparações ósseas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 6893, p.41-9, 2002.
- MARKARIAN, C. F. et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. **Biotechnol Lett**, v. 36, p693-702, 2014.
- 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.
- ZHANG, Z.Y, et al. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 27, p. 126-37, 2009.