



CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL DE RECÉM-NASCIDOS DE PACIENTES COM DIABETES GESTACIONAL.

Thainara Conceição de Oliveira¹
Manoel Pinheiro Lucio Neto²
Melissa Camassola³

RESUMO

Objetivos: analisar os possíveis efeitos do diabetes gestacional (DMG) sobre as características morfológicas, perfil imunofenotípico e proliferação de células estromais derivadas de cordão umbilical de pacientes com diabetes gestacional. **Métodos:** Os cordões de recém-nascidos de mães saudáveis e com diabetes gestacional foram coletados. As células foram isoladas com método usando colagenase tipo I e posteriormente cultivadas. As células foram submetidas às análises quanto a sua morfologia, imunofenótipo, proliferação e formação de colônias. **Resultados:** Todas as células das culturas estabelecidas aderiram ao plástico após o isolamento e apresentaram morfologia fibroblastóide. As células de ambos os grupos foram positivas para os marcadores CD90 e CD105, característicos de células-tronco mesenquimais, porém diferiram em outros marcadores. Não houve diferença estatística entre o potencial de proliferação e percentual de formação de. **Conclusões:** Estes resultados indicam que o diabetes mellitus gestacional não influencia de maneira significativa na morfologia, taxa de proliferação e na capacidade de formação de colônias das células estromais derivadas do cordão umbilical.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Gestacional. Gestação. Células Estromais. Cordão Umbilical.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma alteração metabólica de natureza complexa e multifatorial, caracterizada por aumento dos níveis de glicemia no jejum. É o distúrbio metabólico mais comum da gravidez (GRANDI; TAPIA; CARDOSO, 2015). Está presente em pacientes cuja função pancreática é ineficaz para superar a resistência à insulina, devido à secreção placentária de hormônios diabetogênicos (RUHOLAMIN; ESHAGHIAN;

1 Aluno do curso de graduação Ciências biológicas – Bolsista PIBIC/CNPq

2 Aluno doutorando – PPG Bio saúde ULBRA

3 Professor orientador PPG BIO SAÚDE – camassola@gmail.com

ALLAME, 2014). O DMG compromete o recém-nascido (RN), aumentando as chances de macrosomia, sofrimento fetal, desordens metabólicas, hiperbilirrubinemia, desequilíbrio do crescimento e outras complicações (MESDAGHINIA et al., 2013).

Esse estudo busca analisar os possíveis efeitos do DMG sobre as características morfológicas, proliferação e diferenciação das UCSCs, tentando traçar um paradigma sobre as implicações clínicas da síndrome diabética para o desenvolvimento do neonato. A elucidação de tais mecanismos pode contribuir para melhor compreensão dos desfechos adversos do DMG.

METODOLOGIA

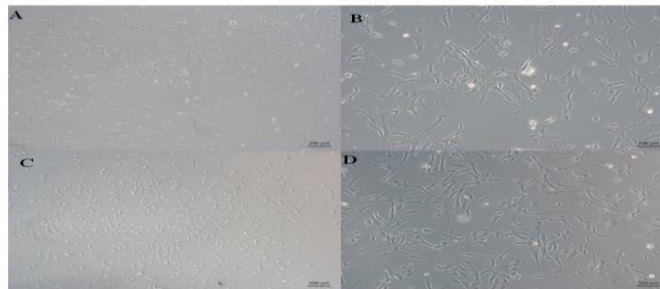
O isolamento das UCSCs foi realizado conforme metodologia já estabelecida no laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos da ULBRA. Os vasos sanguíneos foram retirados dos segmentos de cordão umbilical, e o tecido foi fragmentado mecanicamente. As células-tronco foram isoladas por digestão com colagenase tipo I na concentração de 1 mg/g de tecido por 30-40 minutos, a 37°C e com agitações periódicas. Após neutralização da colagenase com HDMEM e 10% de SFB, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1.800 RPM. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em HDMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em cultura, para expansão e caracterização conforme protocolos já estabelecidos por nosso grupo (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Depois do isolamento as células foram usadas para os experimentos. Após a finalização dos testes todo o material foi descartado como resíduo biológico, conforme normas e rotinas específicas do laboratório de células-tronco e engenharia de tecidos da ULBRA, atendendo a RDC 306/2004 que trata do gerenciamento de resíduos nos serviços de saúde. Todas as células foram utilizadas nos experimentos abaixo descritos entre as passagens 4 a 8.

Caracterização da morfologia

A morfologia das culturas foi analisada por exame periódico em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemanha). Fotomicrografias foram feitas com câmera digital (AxioCamMRc, Carl Zeiss), usando o programa MRGrab 1.0.0.4 (Carl Zeiss).

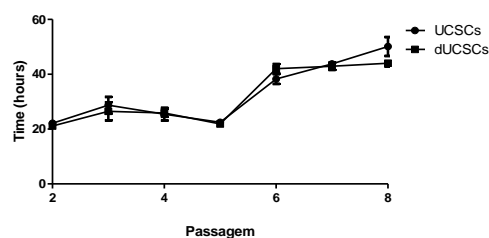
Figura 1: Morfologia das células estromais derivadas de cordão umbilical de RNs de mães com DMG (A e B) e de RNs de mães sem DMG (C e D). Aumento de 20x (A e C) e aumento de 10x (B e D).



Caracterização do potencial de proliferação

O potencial de proliferação das UCSCs foi avaliado por controle contínuo da expansão do número de células nas culturas. As células foram cultivadas até atingir 80-85% de confluência e contadas em cada passagem de P4 a P8. O tempo médio de duplicação (DPT) de cinco culturas independentes foi expresso em horas e calculado da seguinte forma: $\log(\text{número final da célula}) - \log(\text{número de célula inicial}) = K \times T$, onde K é a constante de geração (0,008963) e T é hora em dias.

Figura 2: Proliferação das UCSCs de RNs de mães com rastreio positivo e negativo para DMG. UCSCs: células estromais derivadas de cordão umbilical de RNs de mães sem DMG; dUCSCs: células estromais derivadas de cordão umbilical de RNs de mães com DMG.* $p < 0,05$.



Imunofenotipagem

O perfil de marcadores de superfície das culturas foi avaliado individualmente durante a passagem 5 por citometria de fluxo. Brevemente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e incubadas por 60 minutos a 4°C com anticorpos conjugados com ficoeritrina

(PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC). Esses anticorpos se ligaram a marcadores de superfície CD45, CD31, CD105 e CD90 das células com uma análise de 10.000 eventos. Posteriormente, as células foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 com o programa BD Accuri C6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa, as células obtidas, tanto dos RNs de mães com DMG, quanto dos RNs de mães sem DMG, apresentaram aderência ao plástico e aquisição da morfologia fibroblastóide. Células oriundas de 6 cordões (3 provenientes de RNs de mães com DMG e 3 de RN de mães sem DMG) atingiram 80-85% de confluência após 5 dias, sendo utilizadas nos ensaios seguintes.

Esses dados corroboram com os achados relatados em pesquisas com células humanas (ZHANG; FAN, 2010). Diversos estudos relatam a baixo rendimento para o estabelecimento das culturas de UCSCs (KÖGLER et al., 2006; LEE et al., 2004). As evidências desse comportamento podem ser encontradas em um estudo com 25 doadores de células de UCSCs, em que houve isolamento bem-sucedido em apenas duas amostras, uma com uma cultura de células que apresentava proliferação e pluripotência normais e a outra, com o desenvolvimento de linhagens aneuploides e osteogênese diminuída *in vitro* (Manca et al., 2008).

A caracterização das células por citometria de fluxo permitiu estabelecer a expressão fenotípica das frações celulares em cultura. Em nossa pesquisa, a caracterização do imunofenótipo das UCSCs realizada por citometria de fluxo revelou os marcadores de superfície CD105 e CD90 e ausência de expressão de CD45 e CD31, para as células isoladas dos cordões dos RNs de mães com e sem DMG.

Conforme estabelecido em medula óssea, pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT do inglês International Society for Cellular Therapy), um dos critérios utilizados para classificar uma célula como célula-tronco mesenquimal (MSC do inglês mesenchymal stem cell) e a expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando expressão de CD105, CD73 e CD90 acima de 95% mensurados por citometria de fluxo e expressão menor ou igual a 2% de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006).

Como ainda não foi estabelecido um critério específico, com um painel imunofenotípico ampliado para caracterizar as UCSCs, adaptamos o nosso painel ao já estabelecido pela ISCT, analisando os antígenos CD45, CD31, CD105 e CD90.

Consideramos, também, valores menores ou iguais a 2%, como expressão negativa em nossas análises.

A metodologia de isolamento e cultivo de UCSCs demonstrou ser eficaz já que as células obtidas nesse trabalho apresentaram baixa expressão do antígeno endotelial CD31, em concordância com o trabalho de Jager e Krauspe (2007), a presença de CD31 foi considerada negativa em todas as fontes do cordão umbilical.

Em resumo, em nosso estudo o DMG não interferiu de maneira significativa nas características das UCSCs. Apesar de escassos na literatura alguns estudos relatam que o DMG pode afetar as características das células endógenas ou progenitoras. An et al., 2017, dizem que os possíveis mecanismos desses efeitos são a indução do estresse oxidativo, senescência e disfunções mitocondriais provados pelo DMG.

CONCLUSÕES

Em nosso estudo o DMG não influenciou de maneira significativa nas características de UCSCs, uma vez que a morfologia, proliferação, formação de colônias e diferenciação osteogênica dessas células não demonstraram diferenças entre os grupos com rastreios positivo e negativo para DMG. Novos estudos, com aumento do número de amostras, poderão contribuir para confirmação dos resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

MESDAGHINIA, Elahe et al. Comparison of newborn outcomes in women with gestational diabetes mellitus treated with metformin or insulin: a randomised blinded trial. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 3, p. 327, 2013.

MANCA, M. F. et al. Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. **Cytotherapy**, v. 10, n. 1, p. 54-68, 2008.

DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

DOMINICI, M. L. B. K. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

GRANDI, Carlos; TAPIA, Jose L.; CARDOSO, Viviane C. Impact of maternal diabetes mellitus on mortality and morbidity of very low birth weight infants: a multicenter Latin America study. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 91, n. 3, p. 234-241, 2015.

JÄGER, Marcus et al. Cord blood—an alternative source for bone regeneration. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, n. 3, p. 266-277, 2009.

KÖGLER, Gesine; SENSKEN, Sandra; WERNET, Peter. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. **Experimental hematology**, v. 34, n. 11, p. 1589-1595, 2006.

MESDAGHINIA, Elahe et al. Comparison of newborn outcomes in women with gestational diabetes mellitus treated with metformin or insulin: a randomised blinded trial. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 3, p. 327, 2013.

RUHOLAMIN, Safura; ESHAGHIAN, Safieh; ALLAME, Zahra. Neonatal outcomes in women with gestational diabetes mellitus treated with metformin in compare with insulin: a randomized clinical trial. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 10, p. 970, 2014.

ZHANG, Hong-Tian et al. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. **Differentiation**, v. 79, n. 1, p. 15-20, 2010.