



## POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL DE RECÉM-NASCIDOS DE PACIENTES COM DIABETES GESTACIONAL

Amanda Jacques Braz<sup>1</sup>  
Manoel Pinheiro Lucio Neto<sup>2</sup>  
Melissa Camassola<sup>3</sup>

### Resumo

O cordão umbilical é rico em células não hematopoiéticas multipotentes com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais. Essas células são denominadas de células estromais derivadas de cordão umbilical (UCSCs - do inglês, human umbilical cord derived stromal cells). As UCSCs possuem plasticidade para diferenciação em múltiplas linhagens, semelhantemente ao observado nas células da medula óssea, inclusive para especialização osteogênica. O diabetes mellitus gestacional (DMG) é a doença mais comum da gravidez. Estima-se que a prevalência de DMG no Brasil esteja entre 2,4% a 7,2%. No que diz respeito às implicações fetais do DMG, a hiperglicemia materna, por difusão facilitada, é transmitida ao feto podendo alterar o metabolismo das células presentes no cordão. Essa pesquisa busca quantificar o potencial de diferenciação osteogênica das UCSCs, quando submetidas a meio indutor, através da quantificação de fosfatase alcalina e coloração com alizarina. As células foram obtidas a partir do cordão por digestão enzimática com colagenase tipo I. Os cordões de recém-nascidos de mães saudáveis e com diabetes gestacional foram coletados. As células cultivadas foram submetidas às análises quanto à diferenciação osteogênica in vitro. Ambos os grupos apresentaram capacidade de diferenciação in vitro na linhagem osteogênica. Estes resultados indicam que o diabetes mellitus gestacional não influencia de maneira significativa nas características das células estromais derivadas do cordão umbilical. Novos estudos, com maior número amostral, poderão contribuir para confirmação dos resultados encontrados.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus Gestacional. Células estromais. Cordão Umbilical.

---

<sup>1</sup> Aluno do curso de graduação de Ciências Biológicas – Bolsista PIBIC/CNPq – Amanda\_braaz@outlook.com

<sup>2</sup> Aluno doutorando – PPGBioSaúde ULBRA

<sup>3</sup> Professor do curso de graduação em medicina e do curso de Pós-graduação em Biologia celular e Molecular Aplicada à Saúde – camassola@gmail.com

## **INTRODUÇÃO**

O diabetes mellitus gestacional (DMG) é o distúrbio metabólico mais comum da gravidez (GRANDI, TAPIA e CARDOSO, 2015). Estima-se que a prevalência de DMG no Brasil varia de 2,4% a 7,2% (RIBEIRO et al., 2011).

É necessário que a doença seja diagnosticada e tratada precocemente, pois os desfechos estão relacionados ao início e à duração da intolerância à glicose, bem como à severidade do diabetes materno (MESDAGHINIA et al., 2013). Nessas condições, torna-se necessário o conhecimento de todos os aspectos fisiopatológicos do DMG, relacionados tanto à mãe quanto ao neonato. Um desses aspectos seria a elucidação dos possíveis efeitos gerados pelo DMG às células estromais derivadas do cordão umbilical dos recém-nascidos (RNs). Estudos recentes relataram que o DMG pode afetar o crescimento e as funções das células endógenas ou progenitoras, induzindo estresse oxidativo, senescência e disfunções mitocondriais (AN et al., 2017).

O cordão umbilical é rico em células não hematopoiéticas multipotentes com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais. Essas células são denominadas de células estromais derivadas de cordão umbilical (UCSCs). Estas apresentam potencial de proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens, semelhantemente ao observado nas células da medula óssea. No entanto, como estas células correspondem a apenas uma pequena parcela das células mononucleares presentes em cada amostra, é necessário isolá-las e multiplicá-las *in vitro* para se ter um alto rendimento celular (FORRAZ e MCGUCKIN, 2010). Diversos estudos na medicina humana relataram o isolamento e a capacidade de diferenciação de UCSCs em células ósseas, endoteliais, hepáticas e em linhagens neurogênicas (ZHANG; LIE; WEI, 2009; ZHANG; FAN, 2010).

Esse estudo busca analisar os possíveis efeitos do DMG sobre a diferenciação das UCSCs quando submetidas a meio indutor, a elucidação de tais mecanismos pode contribuir para melhor compreensão dos desfechos adversos do DMG.

## **METODOLOGIA**

Na pesquisa foram envolvidas 15 gestantes portadoras e 15 não portadoras de DMG, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, da Maternidade Dona Evangelina Rosa, localizado na cidade de Teresina-PI. O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Maternidade em questão e ao Comitê de Ética

e Pesquisa da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas-RS (parecer número 1.474.411).

Os cordões foram tratados com colagenase tipo I na concentração de 1 mg/g de tecido por 30-40 minutos, a 37°C e com agitações periódicas. As análises do potencial de diferenciação foram realizadas de acordo com protocolos descritos pelo grupo de laboratório (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Após as células atingirem 80-85% de confluência, as mesmas foram mantidas com meio indutor de diferenciação, composto de DMEM suplementado com 15 mM HEPES, 10% SFB (Soro Fetal Bovino), 10<sup>-8</sup> M dexametasona, 5 µg/mL ácido ascórbico 2-fosfato e 10 mM glicerofosfato. Foram feitas trocas periódicas a cada 3 dias do meio de indução durante 14 dias. Para a observação da diferenciação 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 AlizarinRed S durante 20 minutos para coloração da matriz resultante de cálcio. O corante foi removido e lavado com PBS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise semi-quantitativa de mineralização foi realizada quantificação de cálcio após 14 dias em meio indutor, assim como a quantificação de fosfatase alcalina (ALP). Essas quantificações indicam os níveis de mineralização. A diferenciação osteogênica foi positiva em ambas as células expostas ao meio indutor com aumento de depósito de cálcio nas células induzidas, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre CCM e CCM-O, sem diferença entre as células estromais derivadas de cordão umbilical (UCSCs) e células estromais derivadas de cordão umbilical de recém-nascidos de mães com DMG (dUCSCs) (Figura 1). A atividade de fosfatase alcalina não apresentou diferença significativa entre os grupos testados (Figura 2).

Figura 1: Caracterização do potencial de diferenciação osteogênica, pela quantificação de cálcio, das UCSCs. 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; CCM-O – meio indutor; \* $p < 0,05$ .

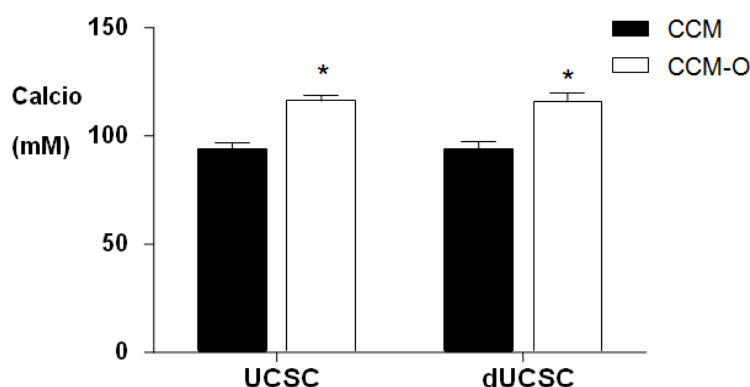
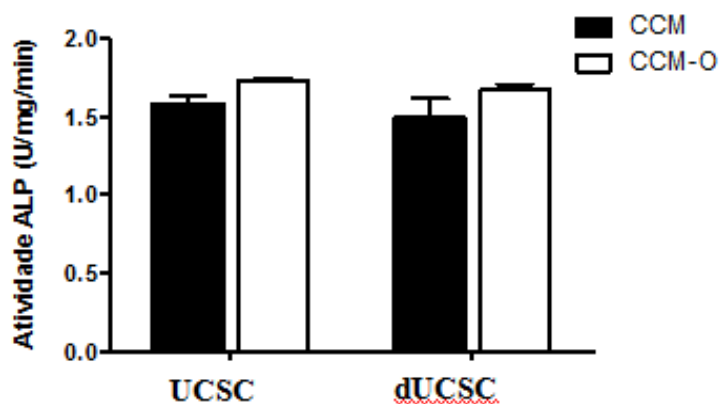


Figura 2: Caracterização do potencial de diferenciação osteogênica, pela quantificação de fosfatase alcalina, das UCSCs. UCSCs: células estromais derivadas de cordão umbilical de RNs de mães sem DMG; dUCSCs: células estromais derivadas de cordão umbilical de RNs de mães com DMG; CCM-O – meio indutor.



Com a indução do processo de diferenciação, direcionamos as UCSCs a adotarem o padrão osteogênico, o que pôde ser evidenciado por depósitos de cálcio extracelulares, corados de vermelho, caracterizando a produção da matriz mineralizada nas amostras estudadas em ambos os grupos. Diante disso, realizamos a análise semi-quantitativa de mineralização pela quantificação da captação do corante vermelho de alizarina, que se fixa em sítios de mineralização (GREGORY et al., 2004). Não houve diferença estatística nos níveis de diferenciação osteogênica e mineralização entre as UCSCs de RNs de mães com e sem DMG. Para confirmação desses resultados realizamos a quantificação dos níveis de fosfatase alcalina (ALP), uma enzima normalmente relacionada ao processo de mineralização da matriz óssea orgânica. Não houve diferença estatística entre os níveis de ALP nos grupos avaliados. Existe certa controvérsia sobre a eficácia de se usar a ALP como um marcador da diferenciação osteogênica. Ainda assim, esta enzima é usada por muitos grupos com tal finalidade (MOREIRA et al., 2004).

Diversos estudos descrevem a capacidade de especialização das UCSCs, não apenas em osteócitos, mas também em condrócitos, adipócitos (SARUGASER et al., 2005; KARAHUSEYINOGLU et al., 2007) e supostamente em cardiomiócitos (WANG et al., 2004; KADIVAR et al., 2006), neurônios e glia (MITCHELL et al., 2003). Além disso, as células do cordão umbilical produzem citocinas semelhantes às células-tronco de medula óssea, fatores estimuladores de colônias de granulócitos e de macrófagos e maior número de passagens para alcançar senescência (TROYER; WEISS, 2008; ZHANG; LIE; WEI, 2009).

## CONCLUSÃO

Em nosso estudo o DMG não influenciou de maneira significativa na capacidade osteogênica entre as UCSC's de recém-nascidos de pacientes com DMG e de gestantes sem DMG. Novos estudos, com aumento do número de amostras, poderão contribuir para confirmação dos resultados encontrados.

Apoio: CNPq, FAPERGS, CAPES e ULBRA.

## REFERÊNCIAS

AN, Borim et al. Gestational Diabetes Affects the Growth and Functions of Perivascular Stem Cells. **Molecules and cells**, v. 40, n. 6, p. 434, 2017.

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.

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.

GREGORY, Carl A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.

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.

MITCHELL, Kathy E. et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. **Stem cells**, v. 21, n. 1, p. 50-60, 2003.

MOREIRA, Patricia L. et al. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 229-237, 2004.

RIBEIRO, Meireluci Costa et al. Pregnancy and gestational diabetes: a prejudicial combination to female sexual function?. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 5, p. 219-224, 2011.

SARUGASER, Rahul et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem cells**, v. 23, n. 2, p. 220-229, 2005.

TROYER, Deryl L.; WEISS, Mark L. Concise review: Wharton's Jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem cells**, v. 26, n. 3, p. 591-599, 2008.

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.