



INDUÇÃO DE OSTEOGÊNSE A PARTIR DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA DE RATO E TECIDO ADIPOSE AO BIOMATERIAL

Jordana Zeferino¹
Vanessa Pinheiro Amaral Lemos²
Melissa Camassola³

Resumo

A engenharia de tecidos é uma tecnologia com o objetivo de auxiliar a regeneração de tecidos danificados buscando aumentar, substituir, ou reconstruir os tecidos danificados ou doentes. A associação de biomateriais a células progenitoras e fatores de crescimento para formação óssea representam importantes adições ao campo da medicina regenerativa. Os biomateriais fornecem o suporte necessário para as células aderirem, crescerem e diferenciarem, e definem a forma geral do transplante. A autorrenovação, multipotência, a disponibilidade na idade adulta e o estado eticamente aprovado para sua utilização fizeram das células-tronco mesenquimais (MSC) as candidatas preferidas para a engenharia de tecidos. Essa pesquisa busca realizar o isolamento celular e verificar o potencial de diferenciação osteogênica das MSCs, quando submetidas a meio indutor, através da coloração com Vermelho de alizarina. As células foram obtidas a partir de medula óssea e tecido adiposo de ratos. As células cultivadas foram submetidas às análises quanto à diferenciação osteogênica *in vitro*. Ambos os grupos apresentaram capacidade de diferenciação *in vitro* nas duas linhagens.

Palavras-chave: Célula-tronco; Biomaterial; Diferenciação.

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa são um campo extremamente interdisciplinar e complexo que requer uma compreensão profunda sobre o desenvolvimento e sustentabilidade de tecidos e órgãos (BERTHIAUME et al., 2011). A engenharia de tecidos

1 Aluno do colégio ULBRA São João – Bolsista PIBIC-EM/CNPq – jordanazr@hotmail.com

2 Aluno doutorando – PPGBioSaúde ULBRA - Bolsista CNPq – vanessap.amaral@gmail.com

3 Professor do curso de Graduação em Medicina e do curso de Pós-graduação em Biologia celular e Molecular Aplicada à Saúde – camassola@gmail.com

envolve o transplante de células e o desenvolvimento de biomateriais biocompatíveis que possuam papel na indução da regeneração dos tecidos (PARK et al., 2013).

Os biomateriais fornecem o suporte necessário para as células aderirem, crescerem e diferenciarem e definem a forma geral do transplante (LANGER; VACANTI, 1993). A célula-tronco é definida como um tipo celular com capacidade de diferenciação em outros tipos celulares e autorrenovação por períodos indefinidos e isso remete ao fato de que elas podem ser expandidas *in vitro* e se diferenciar em vários tipos celulares (JANUSCHKE; NATHKE, 2014).

As MSCs possuem alto potencial clínico para reparar danos ou tecidos em diferentes patologias, tais como defeitos osteocondrais, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas e hematopoiéticas (SALEM et al., 2010). O potencial terapêutico das MSCs pode ser explicado principalmente pela produção de moléculas bioativas, que fornecem um microsistema regenerativo em lesões, e capacidade de resposta a este tipo biomolécula. Estas são capazes de limitar a área lesada e montar uma autorresposta regenerativa através de seus mediadores regenerativos, via corrente sanguínea para o local da lesão (MEIRELLES; NARDI, 2009).

A partir das informações citadas acima ressalta-se: (I) o forte potencial regenerativo das MSCs; (II) a importância de biomateriais que possuam a capacidade de induzir e manter a diferenciação osteogênica; (III) a necessidade de estabelecimento de condições de cultivo de células progenitoras em associação com biomateriais e biomoléculas. Assim, é importante a realização de testes *in vitro* combinando células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSCs) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (ACS) aos biomateriais para utilização em enxertos e transplantes.

Essa pesquisa busca realizar o isolamento celular e verificar o potencial de diferenciação osteogênica das MSCs, quando submetidas a meio indutor, através da coloração com Vermelho de alizarina.

METODOLOGIA

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais, este estudo utilizou seis ratos da linhagem Lewis machos com 90 dias de idade. Os animais foram criados e mantidos em padrão sanitário convencional.

As células derivadas de tecido adiposo (ASC) foram isoladas a partir de tecido adiposo inguinal. Após a remoção da gordura do animal, o tecido foi lavado com solução

salina, cortado em pequenos pedaços e incubado com 110 U/mL de solução de colagenase tipo I por 30 minutos a 37° C. A camada superior, contendo lipídios, foi removida e o restante centrifugado a 800 x g por 10 min. Para cultivo, as células foram ressuspensas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 25 mM HEPES, o meio foi denominado HDMEM. O meio contém 10% de soro fetal bovino (SFB), conforme metodologia estabelecida anteriormente por nosso grupo (Meirelles e Nardi, 2003). As células derivadas de medula óssea (BMSC) foram isoladas a partir do fêmur dos ratos de acordo com procedimento descrito por Meirelles e Nardi (2003). Após o corte de ambas as extremidades do fêmur, a medula óssea foi lavada com 1 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de SFB e cultivadas em 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado 72 h após o isolamento para remover as células não aderentes. Após o isolamento, as células-tronco mesenquimais foram cultivadas em meio de cultura HDMEM com soro fetal bovino e 100 UI/mL Penicilina /100µg/mL Estreptomicina. Ao atingirem cerca de 80% de confluência, as culturas foram repicadas.

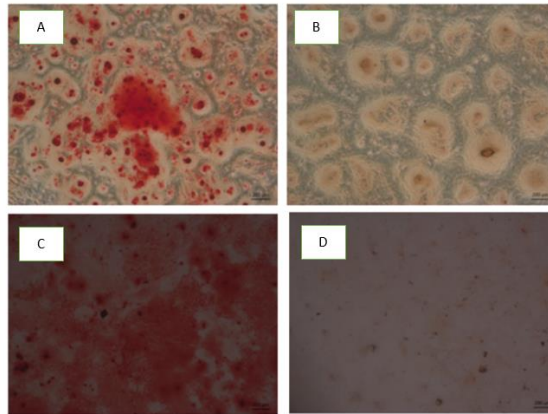
Para indução da diferenciação as células ASC e BMSC foram expostas a meio específico durante 14 dias. Foram feitas trocas periódicas do meio de indução. Para a observação das diferenciações, após o período de indução as camadas de células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e fixadas com 4% de paraformaldeído durante 10 minutos. Para verificar osteogênese, adicionou-se Alizarin Red S durante 20 minutos para coloração da matriz resultante de cálcio. O corante foi removido e lavado com PBS. As placas de cultivo foram visualizadas em microscópio de contraste de fase. Os controles da indução de diferenciação foram mantidos em meio HDMEM pelo mesmo período. Após análise em microscópio, 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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento das células de medula óssea e tecido adiposo foi realizado com sucesso e as células permaneceram aderidas à placa de cultivo, confirmando que as células-tronco adultas estão presentes em todos os órgãos e tecidos (MARX et al., 2015), tais como no tecido adiposo, no cordão umbilical e na medula óssea. (MEIRELLES et al., 2008).

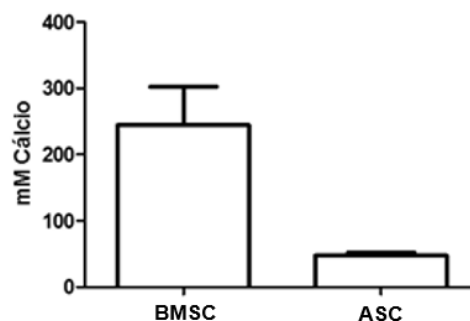
As ASC e BMSC apresentaram capacidade de diferenciação em linhagem osteogênica verificada através de coloração vermelha da matriz, tal característica é resultante do depósito de fosfato de cálcio das células diferenciadas (Figura 1).

Figura 1: Coloração com alizarina. A) ASC Osteogênica; B) ASC controle; C) BMSC osteogênica; D) BMSC controle.



Após as células terem sido coradas com alizarina elas foram processadas e a alizarina foi quantificada. 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). A partir desses resultados também podemos observar que as BMSC apresentam mais matriz de cálcio que as ASC. Isso indica que as BMSCs têm maior potencial de diferenciação osteogênica que ASC,

Figura 2: Quantificação da matriz de cálcio mineralizada expressa em mM nas ASC e BMSC após manutenção em meio indutor por 14 dias.



CONCLUSÕES

As ASC e BMSC isoladas de ratos e mantidas em cultura apresentaram um perfil morfológico de acordo com o esperado de células-tronco mesenquimais. 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

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M.L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress and challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p.403-30, 2011.

da SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. L.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep. 2008.

JANUSCHKE, J.; NÄTHKE I. Stem cell decisions: a twist of fate or a niche market? **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 34, p. 116-23, Oct. 2014.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-96, May. 1993.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; NARDI, N. B. Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. **Stem Cells and Development**, v. 4, n. 7, Jan. 2015.

MEIRELLES, L. da S.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Bioscience**. v. 14, p. 4281-98, Jan. 2009.

PARK, J.H.; PEREZ, R.; JIN, G.Z.; et al. Microcarriers designed for cell culture and tissue engineering of bone. **Tissue Engineering Part B Review**, v. 19, n. 2, p. 172-90, Apr. 2013.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem Cells**, v. 28, n. 3, p. 585-96, Mar. 2010.