

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

\*Moraes, R.<sup>1</sup>; Amaral, V.<sup>2</sup>; Camassola, M.<sup>3</sup>

1. Aluno do curso de graduação em Ciências Biológicas – Bolsista Fapergs; \*eurafaelmoraes@gmail.com  
2. PPGBIOSAUDE – ULBRA  
3. Professor do curso de graduação em Medicina e PPGBioSaúde – melissa.camassola@ulbra.br

As células-tronco mesenquimais possuem potencial clínico para reparar danos ou tecidos em diferentes patologias, incluindo defeitos osteocondrais, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e hematopoiéticas. 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 (ASC) como nas 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). **Diferenciação osteogênica:** Para indução da diferenciação as células ASC e BMSC foram expostas a meio osteogênico durante 14 dias- com trocas periódicas do meio de indução. **Análise semi-quantitativa de mineralização:** Após a coloração da diferenciação osteogênica, realizou-se uma leitura espectrofotométrica (Multiskan Ex original, serial RS-232C) a 540 nm, de uma placa de 96 poços contendo as células previamente incubadas com 500 µL de isopropanol, durante 5 min. Os dados são expressos em média ± desvio padrão. 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  $p < 0,05$ . **Ensaio clonogênico:** plaqueamento com diluição limitante.

### RESULTADOS

As células de BMSC 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. As células obtidas de medula são as mais recomendadas para uso terapêutico em reparações ósseas.

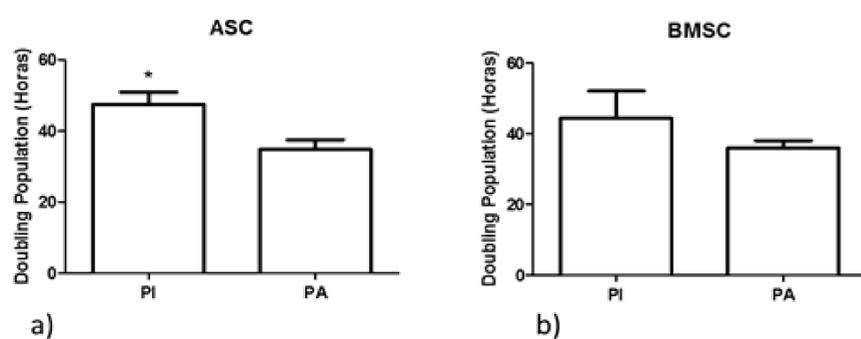


Figura 1. Comparação do tempo de duplicação das células ASC e BMSC em passagem inicial (PI) e passagem avançada (PA). a) ASC. b) BMSC. Tempo de duplicação expresso em horas. \*  $p < 0,05$ , (n = 3).

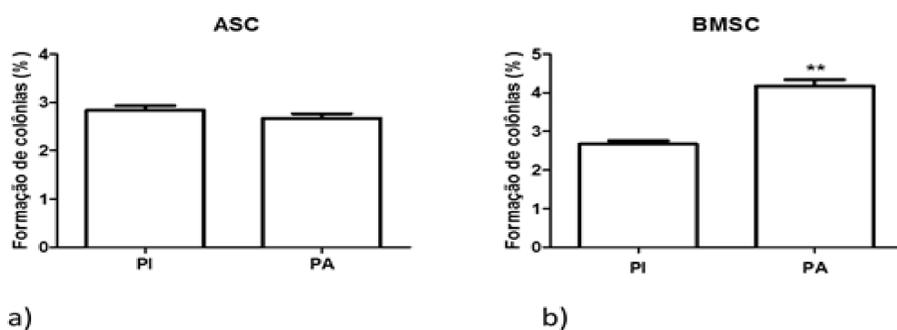


Figura 2. Comparação do potencial de formação de colônias entre passagem inicial (PI) e passagem avançada (PA). Potencial de formação de colônias expresso em porcentagem de células capazes de formar colônias. a) ASC. b) BMSC. \*\*  $p < 0,01$ , n = 3.

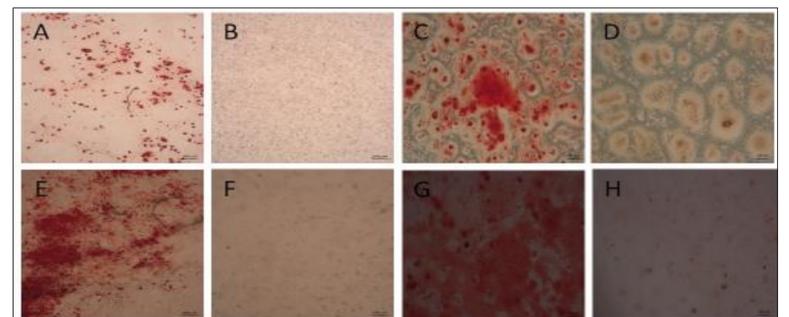


Figura 3. Fotos da diferenciação osteogênica de ASCs em passagens iniciais (p6) e avançadas (p40) e BMSCs iniciais (p6) e avançadas (p40).

(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.

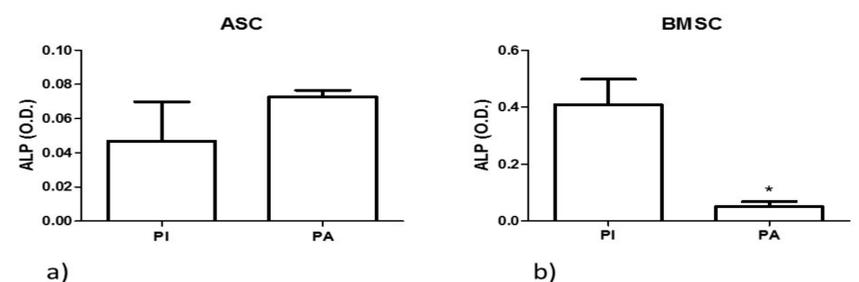


Figura 4. Quantificação da análise indireta dos níveis de ALP em ASC e BMSC em passagem inicial (PI) e avançada (PA).

a) ASC e b) BMSC.  $P < 0,05$ , (n=3).

**Conclusões:** Quando analisamos as duas células quanto à plasticidade osteogênica, fica claro que as BMSC são as mais recomendadas para uso terapêutico em reparações ósseas. As células-tronco mesenquimais que são mantidas em cultura precisam ser monitoradas quanto aos seus biomarcadores funcionais. São alternativas viáveis e indicadas para biomarcadores: proliferação celular, capacidade formadora de colônia e plasticidade celular.