

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

Prestes JP, Amaral VP, Camassola MC,
UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
APLICADA À SAÚDE

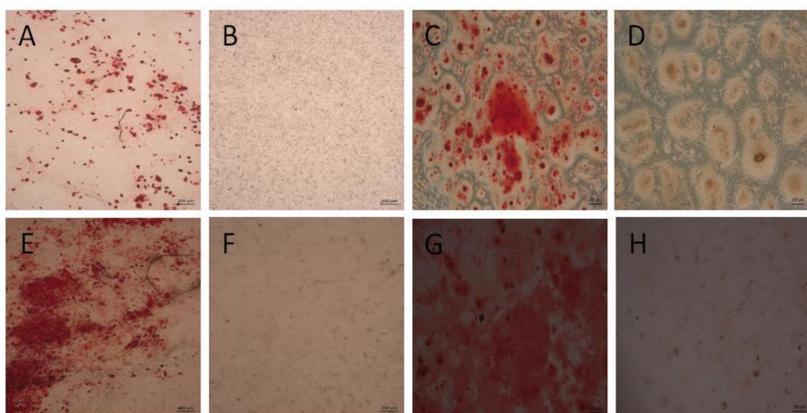
As células-tronco mesenquimais podem ser cultivadas *in vitro* por longos períodos e o cultivo celular prolongado pode induzir alterações indesejadas na sua plasticidade (Rubio et al., 2005). Apesar de conhecimentos já adquiridos até o momento, ainda é necessário explorar mais os aspectos das células-tronco 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

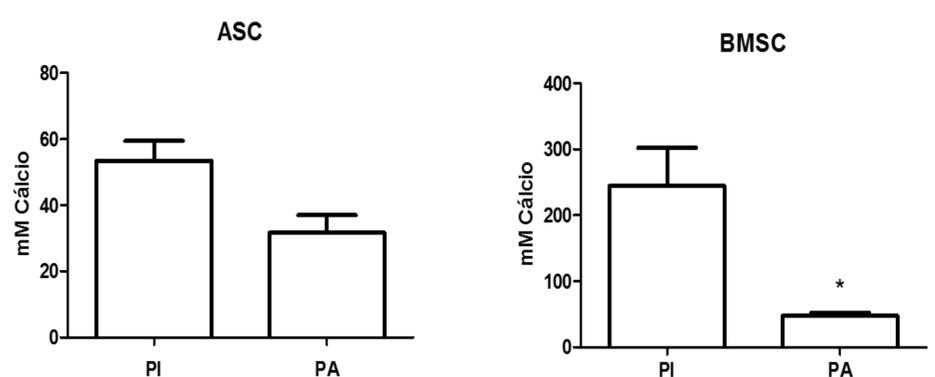
- **Animais:** Foram utilizadas células de três ratos fêmeas da linhagem Lewis com aproximadamente quatro semanas de idade. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética da FEPPS (MEMO no. 02/201, 07 de agosto de 2013).
- **Isolamento e cultivo de rASCs e rBMSCs:** As ASC foram isoladas a partir 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).
- **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 $p < 0,05$.

RESULTADOS

Após as células terem sido coradas com alizarina elas foram processadas e a alizarina foi quantificada (Figura 1). Os valores obtidos foram expressos em mM de cálcio corado (Figura 2).



- 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(p 6) e PA: passagem avançada(p 40). * $p < 0,05$, $n = 3$.

jpedro20091@gmail.com