



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação de marcadores da senescência celular  
replicativa em células tronco mesenquimais humanas.

por

Maria Prates Rivas

Monografia apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Federal da Bahia como exigência para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas,  
modalidade Ecologia: Recursos Ambientais.

Salvador, BA

2013

Data da defesa: 25 de março de 2013

**Banca examinadora**

---

**MSc. Sissi Brandão Carneiro Furtado**  
**Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hospital São Rafael**

---

**MSc. Bruno Solano de Freitas Souza**  
**Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hospital São Rafael**

---

**MSc. Kátia Nunes da Silva**  
**Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hospital São Rafael**

## RESUMO

Células-tronco mesenquimais têm sido cada vez mais utilizadas na pesquisa e medicina regenerativa devido sua capacidade de auto-renovação, diferenciação celular e por serem obtidas de indivíduos adultos, não envolvendo as questões éticas que permeiam o uso das células-tronco embrionárias. Entretanto, a necessidade do cultivo celular para sua utilização está condicionada ao processo de senescência celular replicativa, um processo irreversível da divisão celular *in vitro*, caracterizado por alterações na função e capacidade de proliferação celular. Desse modo, o processo de envelhecimento de células-tronco mesenquimais *in vitro* se tornou uma área de crescente estudo para a terapia celular, a fim de compreender o comportamento dessas células sob cultivo prolongado, assim como, analisar alterações genéticas e funcionais que possam torná-las um fator de desenvolvimento tumoral. Neste trabalho células-tronco mesenquimais, obtidas da medula-óssea de cinco indivíduos, foram cultivadas por doze meses. Essas células foram caracterizadas e avaliadas em relação à morfologia, potencial de diferenciação celular, análise cromossômica e perfil de expressão dos genes NANOG, SOX2, STAT1, ALPL, PLIN1, RUNX2, hTERT, POU5F1 e PPAR $\gamma$ , nas 3<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> passagens. Apesar de apresentarem alterações na morfologia, as células mantiveram a capacidade de diferenciação celular, o perfil de expressão gênica e estabilidade cromossômica não sendo evidenciado diferença significativa nos marcadores utilizados quando comparado passagens inicial e tardia. Estudos que envolvam um maior número de indivíduos, com maior tempo de cultivo celular, assim como a análise de outros marcadores associados a senescência celular replicativa são necessários para um melhor entendimento do processo de cultivo das células-tronco mesenquimais.

**Palavras-chaves:** Célula-tronco. Senescência replicativa. Cultura celular.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells have been increasingly used in research and regenerative medicine due to their capacity for self-renewal, cell differentiation and because they are isolated from adults, not involving ethical issues that permeate the use of embryonic stem cells. However, the need for cell culture use is restricted to the process of cellular replicative senescence, an irreversible process of cell division *in vitro*, characterized by changes in the function and capability of cell proliferation. Thus, the aging process of mesenchymal stem cells *in vitro* has become an area of increasing study for cell therapy in order to understand the behavior of these cells under prolonged cultivation, as well as analyze genetic and functional changes that can make them a factor in tumor development. In this work mesenchymal stem cells obtained from bone marrow of five individuals were grown for twelve months. These cells were characterized and evaluated in relation to morphology, cellular differentiation, chromosomal analysis and expression profile of the genes NANOG, SOX2, STAT1, ALPL, PLIN1, Runx2, hTERT, POU5F1e PPAR $\gamma$ , at the 3rd and 9th passages. Despite presenting changes in morphology, these cells retained the ability to cell differentiation, the gene expression profile and chromosomal stability. Therefore, analyzing the early and late passages significant changes were not observed. Studies involving a larger number of individuals, with longer cell culture, as well as analysis of other markers associated with replicative senescence are needed for better understanding the process of mesenchymal stem cells cultivation.

**Keywords:** Stem cells. Replicative senescence. Cell culture.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA);
- Ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael (CBTC);
- À Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Soares e Dr<sup>o</sup> Ricardo Ribeiro por terem me ensinado a importância da ciência e da busca pelo conhecimento.
- À Sissi Furtado, co-orientadora, por ter acreditado em mim e colaborado em cada fase da confecção deste trabalho.
- À Lilian e Gabriela, por todo companheirismo e ajuda dentro e fora do laboratório.
- A todos que me receberam no Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael e que me proporcionaram um grande aprendizado.
- A todos que fizeram parte desta jornada, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

## ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
AGRADECIMENTOS.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Senescência celular.....	11
1.2. Marcadores de senescência em células-tronco mesenquimais.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Extração e isolamento de células-tronco da medula óssea.....	17
3.2. Cultivo celular.....	17
3.3. Caracterização celular.....	18
3.3.1. Imunofenotipagem.....	18
3.3.2. Citometria de fluxo.....	19
3.3.3. Diferenciação Celular.....	19
3.3.3.1. Diferenciação Adipogênica.....	19
3.3.3.2. Diferenciação Osteogênica.....	20
3.3.3.3. Diferenciação Condrogênica.....	20
3.4. Análise citogenética.....	20
3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

1. Marcação positiva para os anticorpos: CD90; CD44; CD105.	22
2. Marcação negativa para os anticorpos: CD34; CD45; CD117.	22
3. Marcação positiva para os anticorpos CD90; CD44; CD73; CD105.	23
4. Marcação negativa para os anticorpos CD45; CD34; CD19; CD79A.	23
5. MOTRM-10, P3. Diferenciação celular.	24
6. MOTRM-10, P9. Diferenciação celular.	24
7. MOTRM-8. Morfologia celular das CTMs em P3 e P9.	25
8. MOTRM-11, P3. Cariótipo normal (46, XY).	25
9. MOTRM-12, P9. Cariótipo normal (46, XY).	26
10. MOTRM-11, P9. Cariótipo 81~91<4n, XXYY.	26
11. Resultado do qRT-PCR nas passagens P3 e P9 de Células-tronco mesenquimais.	27

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDK	Cinases dependentes de ciclina
CFU-Fs	Colônias formadoras de fibroblastos
CTM	Célula-tronco mesenquimal
HDACs	Histonas desacetilases
HP1	Proteína 1 da heterocromatina
hTERT	Enzima telomerase
MO	Medula óssea
P3	Passagem 3
P4	Passagem 4
P7	Passagem 7
P8	Passagem 8
P9	Passagem 9
P12	Passagem 12
PFA	Paraformaldeído
SAHF	Focus de heterocromatina associado a senescência
SBF	Soro bovino fetal



## 1. INTRODUÇÃO

Células-tronco são definidas como células indiferenciadas com capacidade de proliferação, autorenovação, diferenciação em um gama de linhagens celulares e regeneração tecidual após lesão (POTTEN; LOEFFLER, 1990). Estas são divididas em três grandes grupos, células-tronco embrionárias, células-tronco fetais e células-tronco não embrionárias, ou adultas. As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto sendo classificadas como pluripotentes, ou seja, capazes de se diferenciar em quase todos os tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários. As células-tronco não embrionárias, por sua vez, são provenientes de tecidos específicos de indivíduos adultos (SYLVESTER; LONGAKER, 2004) sendo classificadas como multipotentes, ou seja, capazes de gerar número limitado de células especializadas e quando isoladas da medula óssea são subdivididas em células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais.

As células-tronco mesenquimais (CTM), constituem um grupo de células clonogênicas, caracterizadas por possuir o potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogênica, adipogênica, condrogênica; pela capacidade de proliferação; crescimento *in vitro* aderido ao plástico e por possuir morfologia semelhante a fibroblastos (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). A facilidade de isolamento, o potencial proliferativo e o fato de serem obtidas de indivíduos adultos, tornaram as CTMs alvo de grandes pesquisas científicas, pois estas representam uma importante ferramenta para terapia celular, reduzindo o impacto das questões éticas e complicações imunológicas (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005).

As CTM foram primeiramente descritas em 1867 pelo patologista alemão Julius Cohnheim que, estudando o processo de reparo tecidual, observou que além de células inflamatórias que atingem a lesão através da circulação, havia também uma população de células associadas a fibrilas, que possuíam morfologia semelhante a fibroblastos. Em meados dos anos 70, Alexander Friedenstein realizou na Rússia experimentos envolvendo a incubação de amostras de medula óssea (MO) em garrafas de cultura e constatou a presença de uma fração de células heterogêneas aderentes. Após algumas passagens, estas células clonogênicas crescendo em monocamada possuíam maior homogeneidade, morfologia semelhante a fibroblastos e a capacidade de indução osteogênica, sendo definidas pelo pesquisador como unidades de colônia formadoras de

fibroblastos (CFU-Fs) e, posteriormente, denominadas como células precursoras osteogênicas (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974). Diversos estudos utilizando a metodologia de Friedenstein isolaram estas células e demonstraram sua capacidade de autorenovação e diferenciação em diversos tipos celulares (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; NARDI; MEIRELLES, 2006; SCHWINDT *et al.*, 2005).

Atualmente se sabe que embora a fonte primária de isolamento das CTM em indivíduos adultos seja a MO, estas células podem ser isoladas a partir de distintos tecidos como dente decíduo, tecido adiposo, periósteo, osso trabecular, músculo esquelético, membrana sinovial, sangue, pele ou fluido sinovial (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; NARDI; MEIRELLES, 2006). Estas células estão associadas à presença dos marcadores específicos de superfície celular que incluem CD44, CD29, CD90, CD105 e CD73, característicos de células mesenquimais, e a ausência de CD14, CD45 e CD34 presentes em linhagens hematopoiéticas (LI *et al.*, 2011; SETHE *et al.*, 2006).

As CTM representam aproximadamente 1 em  $3,4 \times 10^6$  das células nucleadas presentes nesta região (WEXLER *et al.*, 2003), necessitando de expansão *in vitro* para a sua utilização em pesquisas e terapia celular. Todavia, o cultivo destas células está condicionado ao processo de senescência celular replicativa (BONAB *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011), considerado um processo essencial e irreversível da divisão celular *in vitro* e caracterizado por um fenótipo complexo, que implica alterações na função e capacidade de replicação, levando a interrupção da proliferação celular (SETHE *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2008).

Ao contrário do que ocorre em células submetidas a apoptose, as células senescentes *in vitro* permanecem vivas, apesar do desequilíbrio das suas funções, o que pode acarretar no acúmulo de alterações e danos celulares, que serão transmitidas às futuras linhagens e, podendo assim, conduzir ao desenvolvimento do processo neoplásico. Por esse motivo o processo de envelhecimento celular é hoje uma das grandes preocupações da comunidade científica quanto a utilização destas na terapia.

Neste trabalho foram analisadas alterações decorrentes da senescência celular replicativa em CTMs humanas cultivadas por 12 meses. Alterações morfológicas, cromossômicas, na expressão gênica e no potencial de diferenciação foram extensamente avaliadas em distintas passagens.

## 1.1 Senescência celular

A senescência celular está diretamente associada aos controles que acontecem na célula durante o ciclo celular. Na fase G1 do ciclo, a célula passa por monitoramentos interno e externo que visam garantir as condições apropriadas à divisão. Para garantir que tais condições intra e extracelulares estejam adequadas à correta duplicação do material genético na fase S, existem dois pontos de checagem em G1, chamados ponto de restrição e ponto de controle (ALBERTS *et al.*, 2004). Para tal regulação, há proteínas com funções controladoras positivas e negativas. Dentre as controladoras positivas estão as cinases dependentes de ciclina (CDK), que são ativadas somente em determinadas fases do ciclo, possuindo atividade catalítica, em que realizam a fosforilação de proteínas específicas, e as ciclinas, que agem como ativadoras de CDK, ao formar o complexo ciclina-CDK. Realizando o controle negativo do ciclo e envolvidas com a senescência celular, há as proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclina (CKI), que interagem com o complexo ciclina-CDK ou CDK, impedindo a sua atividade de cinase e as proteínas supressoras de tumor, que atuam impedindo a divisão celular, como p53 e pRb.

Quando a célula entra na fase G1, ocorre a síntese da ciclina D, responsável pela ligação e conseqüente ativação de CDK4, CDK6 e ciclina E, que atua como subunidade ativadora de CDK2 (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Deste modo, a fase G1 pode ser caracterizada pelo acúmulo de complexos moleculares ciclina-CDKs responsáveis principalmente pela fosforilação da proteína retinoblastoma (pRB) (COOPER; HAUSMAN, 2007). Esta proteína, considerada supressora de tumor, atua como inibidora do ciclo celular, pois quando ativa se conecta ao fator de transcrição E2F, impossibilitando a transcrição de genes necessários para o prosseguimento do ciclo. Porém, com o início da fase G1, os complexos ciclina-CDKs atuam fosforilando e, assim, inativando a proteína pRB (NARITA *et al.*, 2003). Desta forma, há a liberação do fator de transcrição E2F, responsável pela ativação da transcrição de genes que codificam proteínas necessárias para a passagem a fase S, a partir da síntese de complexos G1/S-CDK e S-CDK, como por exemplo, ciclina A, E e CDK2 (ALBERTS *et al.*, 2004).

O mecanismo molecular da senescência celular é desencadeado pela transcrição do *locus* INK4a/ARF, havendo a síntese e acúmulo das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup> (ANDREU *et al.*, 2005; JANZEN *et al.*, 2006). Estas duas proteínas estão envolvidas com

os pontos de checagem do ciclo celular na fase G1, onde a primeira está relacionada com o ponto de restrição e a segunda com o ponto de controle.

A proteína p16<sup>INK4a</sup> atua como uma CKI, de modo que o seu acúmulo inibe a ação dos complexos CDK4 e CDK6, e consequente fosforilação da proteína pRb. Uma vez hipofosforilada, esta proteína se torna ativa e capaz de conectar-se a E2F, impossibilitando a atuação deste na indução da transcrição de genes, o que acarreta no bloqueio do ciclo celular, pois não há síntese dos complexos S-CDK e G1/S-CDK (ALBERTS *et al.*, 2004). Acredita-se também que a ativação da proteína pRb esteja relacionado com a formação de focus de heterocromatina associados a senescência (SAHF) (NARITA *et al.*, 2003). Para que ocorra este processo, membros da família Rb primeiramente recrutam histonas desacetilases (HDACs) para regiões onde estão localizados os promotores dependentes de E2F e, desta forma, HDACs removem o grupo acetil de histonas. Com a desacetilação, há o direcionamento de histonas metiltransferases (HMT), responsáveis pela adição de um grupo metil à lisina da histona. Uma vez metilada, a histona terá um sítio de ligação com a proteína 1 da heterocromatina (HP1), proteína remodeladora que possibilita a modificação da estrutura de enovelamento do DNA, em que há uma forte compactação da cromatina, impedindo a leitura destas regiões no processo de transcrição genética (NARITA *et al.*, 2003). Deste modo, a formação de SAFHs mediada pela ação de pRb promove o silenciamento genético de regiões importantes para a fase S.

A outra via de regulação do ciclo celular ocorre através do acúmulo da proteína p14<sup>ARF</sup>, co-responsável pela fosforilação da proteína supressora de tumor p53 (SHARPLESS; DEPINHO, 2004). Em condições normais para ocorrência do ciclo celular, esta proteína encontra-se conectada a proteína HMD2, responsável por estimular a degradação de p53 através da ubiquitinação, processo em que uma proteína é marcada por moléculas de ubiquitina com o objetivo de ser reconhecida e degradada por proteossomos (ALBERTS *et al.*, 2004). Porém, com o acúmulo de p14<sup>ARF</sup> há a ligação desta com HMD2, possibilitando que a proteína p53 fique livre à atividade fosforiladora de cinases, o que irá reduzir a afinidade de p53 com HMD2, diminuindo a sua degradação, além de tornar a proteína mais estável (ANDREU *et al.*, 2005). Uma vez fosforilada e em alta concentração, a proteína p53 atuará como fator de transcrição da proteína p21. Esta tem função de inibição de cinases dependentes de ciclina, através do bloqueio da ligação protéica entre cinase e ciclina e, assim, impedindo a ativação dos complexos G1/S-CDK e

S-CDK, estando co-relacionada também com a hipofosforilação de pRb (ALBERTS *et al.*, 2004; NARITA *et al.*, 2003; SHARPLESS; DEPINHO, 2004).

## 1.2 Marcadores de senescência em células-tronco mesenquimais

Alterações na morfologia celular constituem um importante indicador do estado senescente. Neste estado as células apresentam maior tamanho, formato irregular, citoplasma granular com muitas inclusões e liberação de detritos celulares no meio (BONAB *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2008). A diminuição na razão de crescimento e potencial de proliferação são características do estado de senescência, em que há um aumento no tempo de duplicação celular, assim como ocorre à diminuição na capacidade de divisões realizadas, ou seja, a perda do potencial proliferativo (SETHE *et al.*, 2006). Este último é retratado na literatura como o “Limite Hayflick”, fenômeno que ocorre em condições *in vitro*, no qual após um determinado período e consecutivas passagens, a célula para de realizar divisão celular, sendo que este número de passagens é variável entre tipos celulares e espécies das quais foram obtidas (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961).

Modificações na capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares também são relatadas como marcadores de senescência replicativa em CTM. Contudo, existem estudos controversos na literatura. Enquanto alguns autores apontam que há perda no potencial de diferenciação osteogênica e ganho de potencial adipogênico, outros demonstraram que apesar de haver diminuição na capacidade de diferenciação em osteoblastos, o potencial adipogênico não é alterado com o cultivo prolongado destas células (ROSS *et al.*, 2000; STENDERUP *et al.*, 2003). Em contrapartida, Bonab e colaboradores (2006), afirmam que há diminuição em ambos potenciais de diferenciação, porém a perda da capacidade adipogênica é maior que o potencial osteogênico.

Alterações moleculares relacionadas à senescência replicativa como mudanças no comprimento do telômero e a relação deste processo com a diminuição da atividade da enzima telomerase (hTERT), responsável pela manutenção desta sequência cromossômica também foram observadas (FLORES; BLASCO, 2010). Por outro lado alguns estudos que demonstram a diminuição do telômero com o processo de divisão celular relatam também a ausência da expressão de telomerase em CTM (SHAY *et al.*, 2001). Já Noh e colaboradores não encontraram redução significativa no comprimento do

telômero ao cultivar estas células. Diferenças na expressão genética sob condições de senescência replicativa foram encontradas, havendo aumento e/ou diminuição na regulação de alguns genes quando comparados a sua expressão em células de passagens iniciais (NOH *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2009). Mudanças de caráter epigenético durante o cultivo de CTM envolveram os processos de metilação do DNA e acetilação de histona, onde foram descritas alterações na acetilação da histona H3 e nos níveis de metilação genética (LI. *et al.*, 2011).

Em 2006, Bonab e colaboradores acompanharam o processo de senescência em CTM oriundas de MO *in vitro*. Estas células apresentaram anormalidades morfológicas, envolvendo modificações na forma e tamanho, além da presença de citoplasma granular após 3 meses de cultivo. A análise do potencial de diferenciação em linhagens adipogênicas e osteogênicas também foi realizada comparando as passagens iniciais e senescentes e, como resultado, foi notado a diminuição da capacidade de diferenciação celular, destacando que a perda do potencial de diferenciação em adipócitos foi mais acentuada do que o potencial osteogênico. Além destes marcadores, foi acompanhado pelo grupo o comprimento dos telômeros das CTM em distintas passagens através da técnica de Southern blot. Ao final, foi demonstrado que houve o encurtamento telomérico, onde a média do comprimento na passagem 1 foi de 9.19 kbp enquanto na passagem 9 a média foi de 8.75 kbp.

Em estudo realizado com CTM oriundas da MO por Wagner e colaboradores (2008), alterações relacionadas com o processo de senescência celular replicativa, foram observadas entre as passagens 7 e 12. Dentre elas, foram ressaltados o decaimento gradual da proliferação celular em todas as amostras a partir da passagem 7, acompanhado por alterações na morfologia celular, onde as CTM tornaram-se mais largas, com formato irregular, achatado e citoplasma granular. A análise imunofenotípica, através da citometria de fluxo, foi realizada para caracterização destas células a partir da presença de marcadores de superfície celular CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e ausência dos marcadores característicos de células-tronco hematopoiéticas CD34 e CD45. E quando realizada a citometria de fluxo em passagens senescentes, foi observado a diminuição do nível de expressão destes antígenos na superfície das CTM, indicando que a composição e o nível de expressão dos marcadores de superfície variam em cultivo por longo período. Para analisar possíveis modificações no perfil de expressão gênica devido à senescência celular, a técnica de qRT-PCR foi utilizada em passagens

iniciais e tardias. Genes que apresentaram maior expressão em passagens tardias incluem: glicoproteína humana NMB (GNMPB), relacionada com a diferenciação e função em osteoblastos; protease homóloga associada a regeneração muscular (RAMP); transdutor de sinal ativador da transcrição 1 (STAT1), envolvido com a regulação das sequências interferon  $\gamma$ -ativadas. Foi encontrado também a diminuição da expressão gênica em passagens senescentes em comparação a passagem inicial, como no caso do ácido hialurônico sintetase-1 (HAS1), que medeia a expressão de polissacarídeos importantes na constituição da matriz extracelular.

Em 2010, Noh e colaboradores demonstraram que o cultivo *in vitro* de CTM acarreta no estabelecimento da senescência celular, envolvendo a diminuição na razão de proliferação celular e alterações morfológicas. Investigando a relação entre o comprimento do telômero e o processo da senescência replicativa, o grupo não encontrou redução significativa no tamanho do telômero entre as passagens 4 e 12, sendo que nesta última, os marcadores de senescência celular descritos acima já eram observados. Em busca de outros fatores responsáveis pelo desencadeamento da senescência, o grupo realizou a técnica de Western blot para examinar a expressão das proteínas inibitórias do ciclo celular, p16<sup>INK4a</sup>, p14, p21 e p53. Como resultado, foi encontrado a diminuição na expressão da proteína p21, ausência de expressão de p14 e nenhuma alteração significativa no nível de expressão de p53 entre as passagens iniciais e senescentes. No entanto foi observado aumento significativo no nível da proteína p16<sup>INK4a</sup>, sendo indicado a sua associação com a indução da senescência em CTM.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o processo de senescência celular em CTM humanas derivadas da medula óssea, cultivadas até a passagem 9.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar as CTM através das técnicas de imunofenotipagem, citometria de fluxo e diferenciação nas linhagens celulares adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas.
- Avaliar modificações cromossômicas nas passagens inicial e tardia.
- Avaliar mudanças na morfologia celular em CTM cultivadas por 12 meses.
- Avaliar alterações no potencial de diferenciação em linhagens celulares condrogênicas, adipogênicas e osteogênicas, em passagens inicial e tardia.
- Avaliar a manutenção do perfil de expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos com a osteogênese e adipogênese, capacidade de autorenovação, manutenção da pluripotência e presença da enzima telomerase.



### **3. METODOLOGIA**

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael (CBTC), Salvador, BA.

#### **3.1. Extração e isolamento de células-tronco da medula óssea**

O aspirado da MO de 5 indivíduos sem doenças neoplásicas foi coletado por punção aspirativa da crista ílica ou posterior, com material estéril, após anti-sepsia e anestesia local, na quantidade de 50 a 65 mL, sendo cultivados em separado. As amostras foram processadas imediatamente após terem sido coletadas e identificadas como MOTRM-8, MOTRM-9, MOTRM-10, MOTRM-11 e MOTRM-12.

As células mononucleares foram isoladas por gradiente de Ficoll-Hypaque e mantidas em garrafas de cultura de 125cm<sup>2</sup> em concentração de  $1 \times 10^7$  células por garrafa para obtenção de células mesenquimais. As células foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM crescido de L-glutamina (2Mm/l), gentamicina a 1%, 2,4 g/L de HEPES, 2g/L de bicarbonato de sódio e 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) sendo mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

As CTMs foram isoladas da medula óssea por sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão, sem perda da sua capacidade multipotencial em meio de cultivo pobre em glicose com altas concentrações de aminoácidos e proteínas, sem citocinas. As células foram cultivadas por aproximadamente sete dias, quando foi adicionado um novo meio de cultivo, após a remoção do meio antigo e das células não aderentes.

#### **3.2. Cultivo celular**

As células foram plaqueadas em garrafa de cultivo celular estéril de 75cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de soro SBF e 625uL de Sulfato de Gentamicina (40mg). As amostras dos pacientes foram cultivadas por 12 meses, sendo mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao atingir 80-90% de confluência as células foram destacadas da placa com solução de tripsina a 0,05% para que fossem desfeitas as ligações célula-célula e entre células e superfície de adesão. Após a tripsinização, a suspensão celular foi coletada, transferida para um tubo falcon de 15ml e centrifugadas

durante 10 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi dispensado e o pellet resultante ressuspenso com 1ml de meio  $\alpha$ -MEM. Após a dissociação do pellet a suspensão celular foi utilizada para expansão celular em novas garrafas, montagem de placas para diferenciação, caracterização por imunofenotipagem, controle citogenético e criopreservação para alíquotas de reserva.

### 3.3. Caracterização celular

#### 3.3.1. Imunofenotipagem

A caracterização fenotípica foi realizada na 4ª passagem (P4) de todas as linhagens de CTMs. Para este ensaio as células em cultura foram semeadas em placa estéril de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13mm e mantidas em cultivo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao início do processo de marcação celular, foram realizadas duas lavagens com meio  $\alpha$ -MEM não suplementado durante 3 minutos. Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% durante 15 minutos e ao fim deste período realizaram-se duas lavagens com PBS (solução tampão fosfato) por 3 minutos. Em seguida as ligações inespecíficas foram bloqueadas com a solução *Background Blocker* durante 10 minutos. Após este período os anticorpos primários foram utilizados nas seguintes diluições: anti-CD44 (Zymed) 1:100, anti-CD34 (Zymed) 1:50, anti-CD45 (BioSource) 1:50, anti-CD90 (BD Biosciences) 1:50, anti-CD105 (BD Biosciences) 1:50, produzidos em camundongo, e anti-CD117 (Abcam) 1:50, produzido em coelho, foram adicionados e incubados overnight a 4°C. Todos os anticorpos foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso.

Após incubação os poços foram lavados três vezes com PBS durante 3 minutos e incubados a temperatura ambiente por 1 hora com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 568 ou anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 546, ambos produzidos em cabra e diluídos 1:200 em PBS/BSA 1%. Ao final, os poços foram lavados três vezes com solução PBS e as lâminas montadas com *VectaShield* contendo DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) para coloração nuclear e posterior observação em microscópio confocal *Olympus Fluoview 1000*.

### **3.3.2. Citometria de fluxo**

A caracterização imunofenotípica por citometria foi realizada na 4ª passagem (P4) de todas as linhagens de CTMs. Para este ensaio as células foram destacadas da garrafa de cultura com solução de tripsina a 0,25%, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas  $5 \times 10^5$  células, em tubos eppendorf. Em cada tubo adicionou-se 500µL de solução salina e estes foram submetidos a centrifugação para lavagem do meio. Os anticorpos foram colocados no respectivo eppendorf e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Passado este período, foram adicionados 200µL de solução salina, seguido de centrifugação, para lavagem dos reagentes. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em 500µL com solução salina, sendo transferido para os tubos de citometria. Por fim foi feita a fixação com PFA 1% e análise da marcação através do citômetro BD LSRFortessa™.

Os anticorpos utilizados foram: CD105FITC (RD System); CD73PE (BD Biosciences); CD45 PE (BD Pharmingen); CD 45 PerCP (BD Biosciences); CD90APC (BD Biosciences); CD34PE (BD Biosciences); CD44FITC (BD Biosciences); CD19FITC (BD Biosciences) e CD79aPE (BD Biosciences).

### **3.3.3. Diferenciação Celular**

#### **3.3.3.1. Diferenciação Adipogênica**

Para a diferenciação adipogênica as células foram cultivadas em placa estéril de 24 poços, a uma densidade inicial de  $4 \times 10^4$  células por poço em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF. Após 24 horas este foi substituído por meio de indução da diferenciação (*kit StemPro Adipogenesis Differentiation* - GIBCO). Em todos os ensaios foram mantidos um grupo controle, sendo este cultivado apenas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado. Para coloração das células foi utilizado a solução *Oil Red*, possibilitando a análise dos depósitos de gordura intracelular apenas nas células que se diferenciaram.

### **3.3.3.2. Diferenciação Osteogênica**

Para a diferenciação osteogênica as células foram cultivadas em placa estéril de 24 poços, a uma densidade inicial de  $4 \times 10^4$  células em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF. Após 24 horas este foi substituído por meio de indução da diferenciação (*kit StemPro Osteogenesis Differentiation* - GIBCO). Em todos os ensaios foi mantido um grupo controle, sendo este cultivado apenas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado. Para coloração das células foi utilizado a solução vermelho de alizarina, possibilitando a análise da deposição de cálcio apenas nas células que se diferenciaram.

### **3.3.3.3. Diferenciação Condrogênica**

Para a diferenciação condrogênica as células foram cultivadas em placa estéril de 24 poços, a uma densidade inicial de  $4 \times 10^4$  células em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de SBF. Após 24 horas este foi substituído por meio de indução da diferenciação (*kit StemPro Chondrogenesis Differentiation* - GIBCO). Em todos os ensaios foi mantido um grupo controle, sendo este cultivado apenas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado. Para coloração das células foi utilizado a solução *Alcian Blue*, possibilitando a análise de proteoglicanos nas células que se diferenciaram.

## **3.4. Análise Citogenética**

A análise citogenética foi realizada através da técnica de bandeamento GTG, bandas G obtidas por tripsinização e coradas com Giemsa, nas 3ª e 9ª passagens das CTM. Para interrupção do ciclo celular e obtenção dos cromossomos metafásicos nas garrafas com cerca de 70% de confluência celular, foi adicionado 0,1mL de colchicina a 0,1%. Após 4 horas as células foram transferidas para tubo falcon de 15ml, centrifugadas e após retirada do sobrenadante foram expostas a solução hipotônica de cloreto de potássio a 0,075M por 30 minutos a 37°C. A fixação foi realizada através de consecutivas lavagens das células em solução fixadora de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético). Para o bandeamento GTG, as lâminas foram tratadas enzimaticamente com solução tripsina/PBS a 0,2% seguida de coloração com Giemsa. Foram analisadas 15 metáfases de cada

amostra, com auxílio de microscópio Olympus BX61 e os cromossomos classificados segundo o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 2005).

### 3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A avaliação da expressão gênica das CTM foi realizada através do PCR quantitativo em Tempo Real. Para esta técnica, o RNA total foi isolado a partir da retirada do meio de cultura e adição de 2ml de *TRIzol Reagent* (Life Technologies) na garrafa de cultura das células. A quantificação do RNA extraído foi determinada com espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), a partir de 1ng de cada amostra, com a concentração calculada em ng/ul. Para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit* de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Sendo adicionados 17,5µL da solução (RNA + água) + 7,5µL de mix, obtendo-se um volume final de 25µL para cada amostra. Esta mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 37°C por duas horas. Em uma placa de 96 poços foram adicionados, em cada poço, as sondas analisadas, o reagente *Taqman Universal Master Mix* (Applied Biosystems) e a amostra de cDNA, formando um volume final de 10 µL. As reações foram realizadas em duplicatas com auxílio do aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), sob condições padrão de ciclos térmicos. Os valores médios Ct (limiar de ciclo), obtidos a partir das medidas das duplicatas, foram utilizados para calcular a expressão dos genes alvo, tendo o gene GAPDH como normalizador, usando a fórmula  $2^{-dCt}$ .

#### 4. RESULTADOS

A expressão dos marcadores de superfície celular através da imunofluorescência foi realizada em P4 e todas as amostras apresentaram marcação positiva para CD90, CD105, CD44 (figura1). A expressão foi negativa para os marcadores CD45, CD34 e CD117 em todas as amostras (figura2).

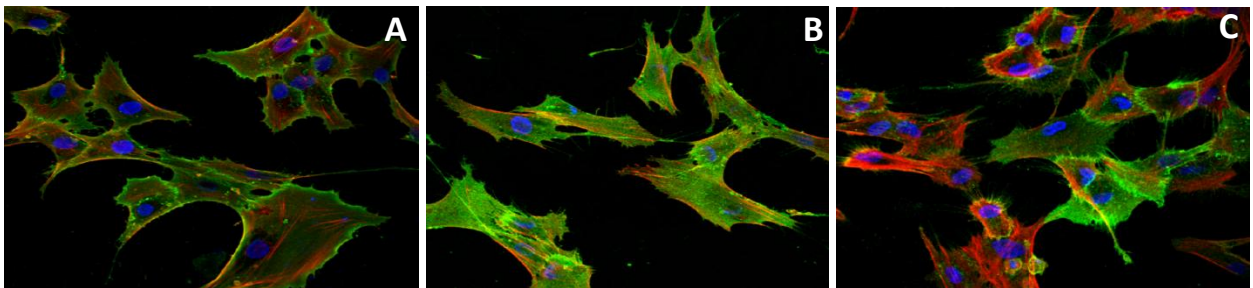


Figura1. Marcação positiva para os anticorpos: CD90 – MOTRM-8(A); CD44 – MOTRM-8(B); CD105 – MOTRM-11(C). Coloração do núcleo em azul (DAPI); Coloração dos filamentos de actina em vermelho; Anticorpos na superfície celular em verde.

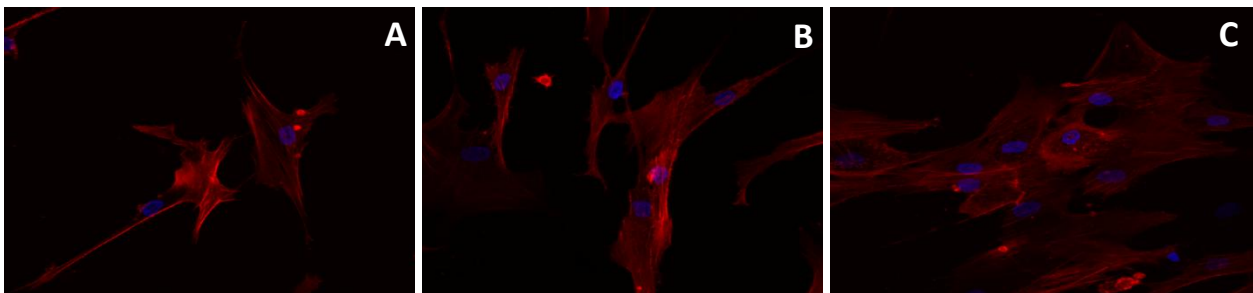


Figura2. Marcação negativa para os anticorpos: CD34 – MOTRM-11(A); CD45 – MOTRM-9(B); CD117 – MOTRM-9(C). Coloração do núcleo em azul (DAPI); Coloração dos filamentos de actina em vermelho;

A análise por citometria de fluxo em P4 apresentou expressão positiva para os marcadores CD90, CD44, CD105 e CD73 em todas as amostras (figura3). Enquanto que os marcadores CD45, CD34, CD19 e CD79a, tiveram expressão negativa em todas as amostras (figura4).

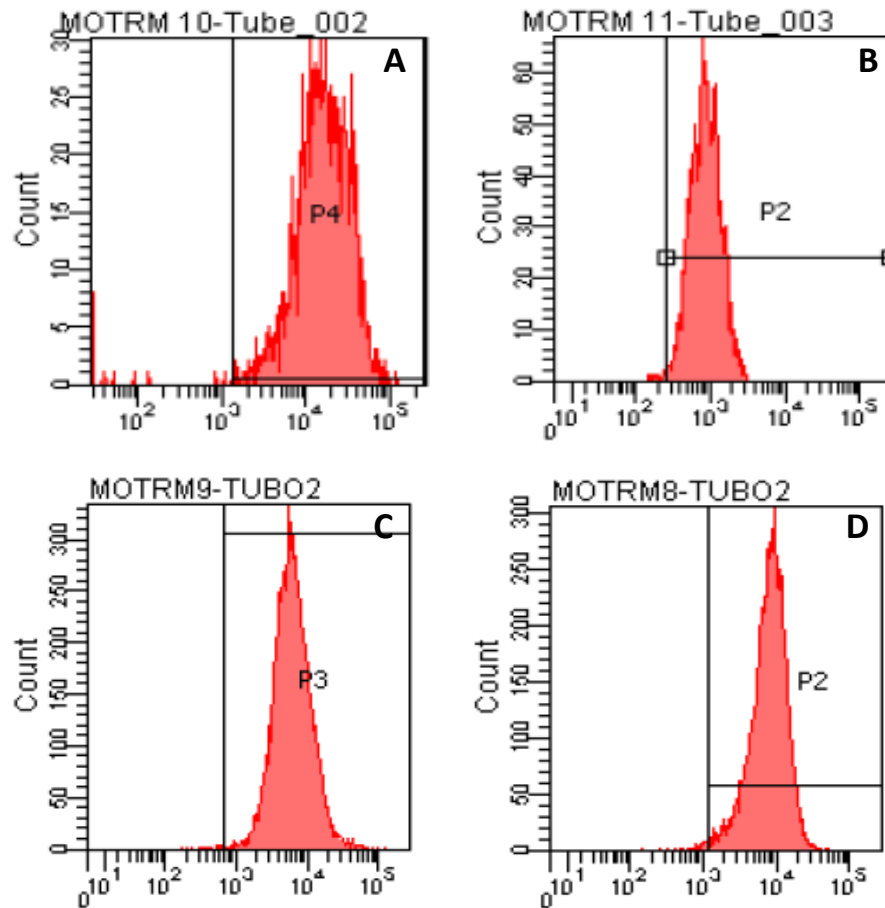


Figura3. Marcação positiva para os anticorpos CD90(A); CD44(B); CD73(C); CD105(D).

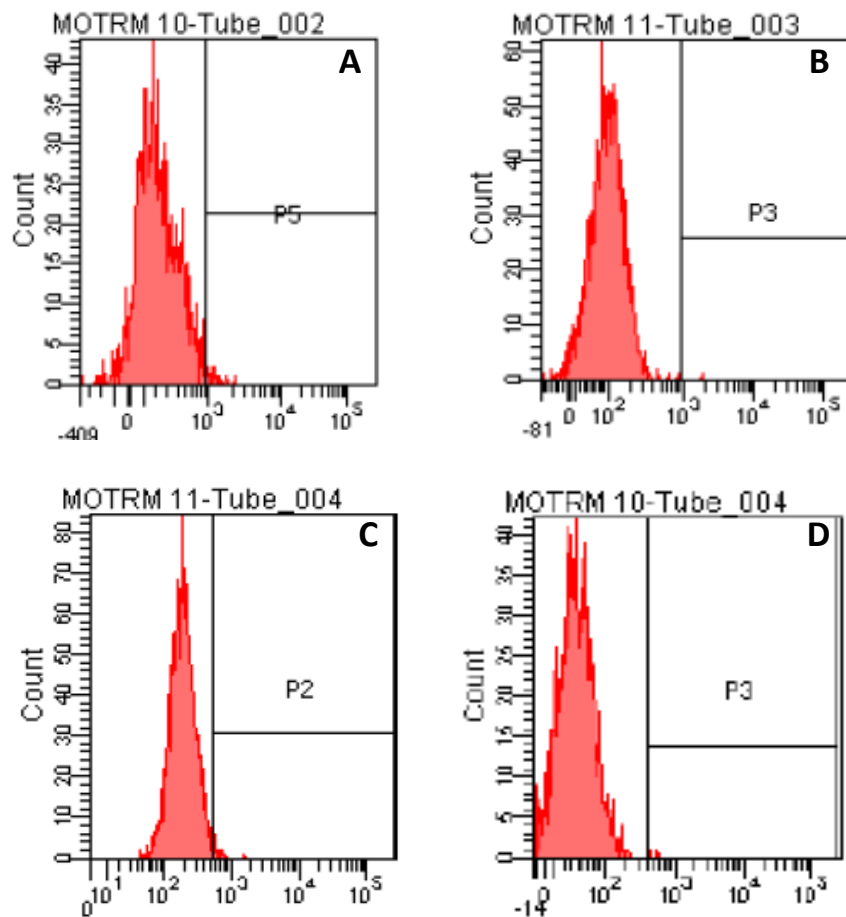


Figura4. Marcação negativa para os anticorpos CD45(A); CD34(B); CD19(C); CD79A(D).

Foram observadas alterações na morfologia celular entre as passagens iniciais e tardias. Em P3 as CTMs apresentam morfologia fibroblastóide. Enquanto em P9 as células possuíam tamanho maior e mais achatado, citoplasma granuloso e com liberação de detritos celulares no meio de cultura (figura7). O tempo de cultivo celular entre as passagens inicial e tardia apresentou alteração, de modo que para obter confluência e consequente expansão em novas garrafas, estas células tardavam de 2 a 3 dias na passagem 3, enquanto que em P9 este período variou para 5 a 6 dias de cultivo.



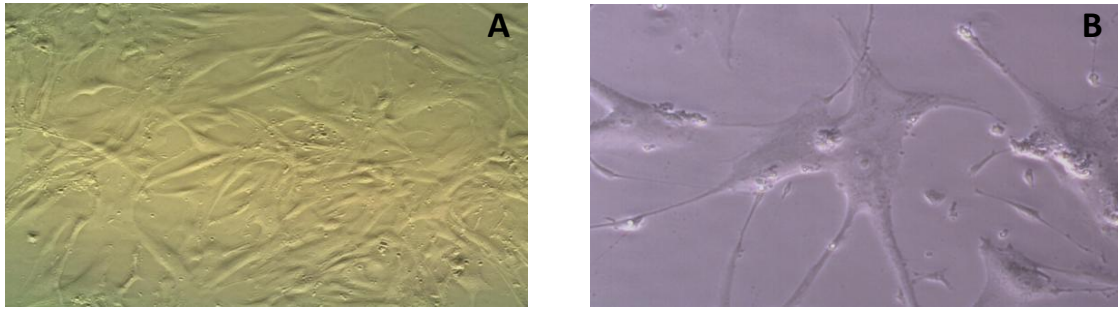


Figura7. MOTRM-8. Morfologia celular das CTMs em P3(A) e P9(B).

A avaliação da capacidade de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica das CTMs foram realizadas nas passagens P3 e P9, em todas as amostras. Em P3 a diferenciação ocorreu em todas as linhagens sendo a formação de adipócitos e osteócitos observadas após 14 dias, enquanto que a presença de condrócitos foi verificada com 21 dias de cultivo com meio de diferenciação apropriado (figura5). A diferenciação em todos os três tipos celulares também foi observada em P9, sendo que o período para observação da formação de osteócitos e condrócitos foi mantido e a formação de adipócitos foi verificada após 20 dias (figura6).

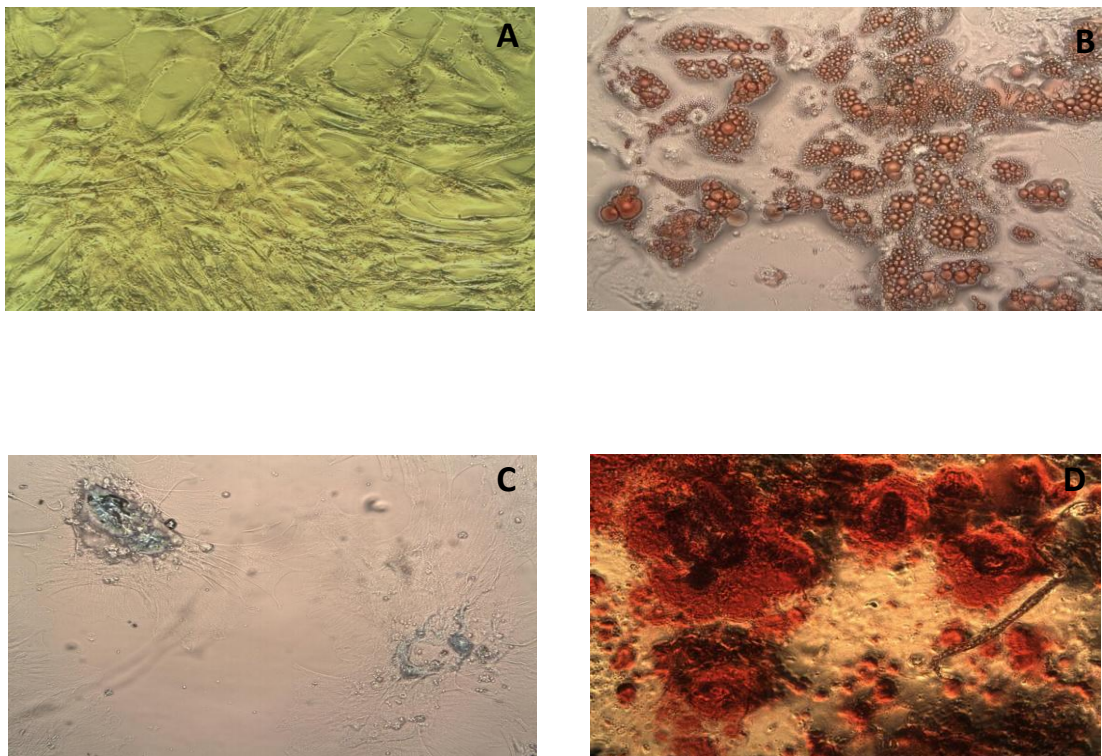


Figura5. MOTRM-10, P3. Diferenciação celular. Controle(A); Adipócitos(B); Condrócitos(C); Osteócitos(D).

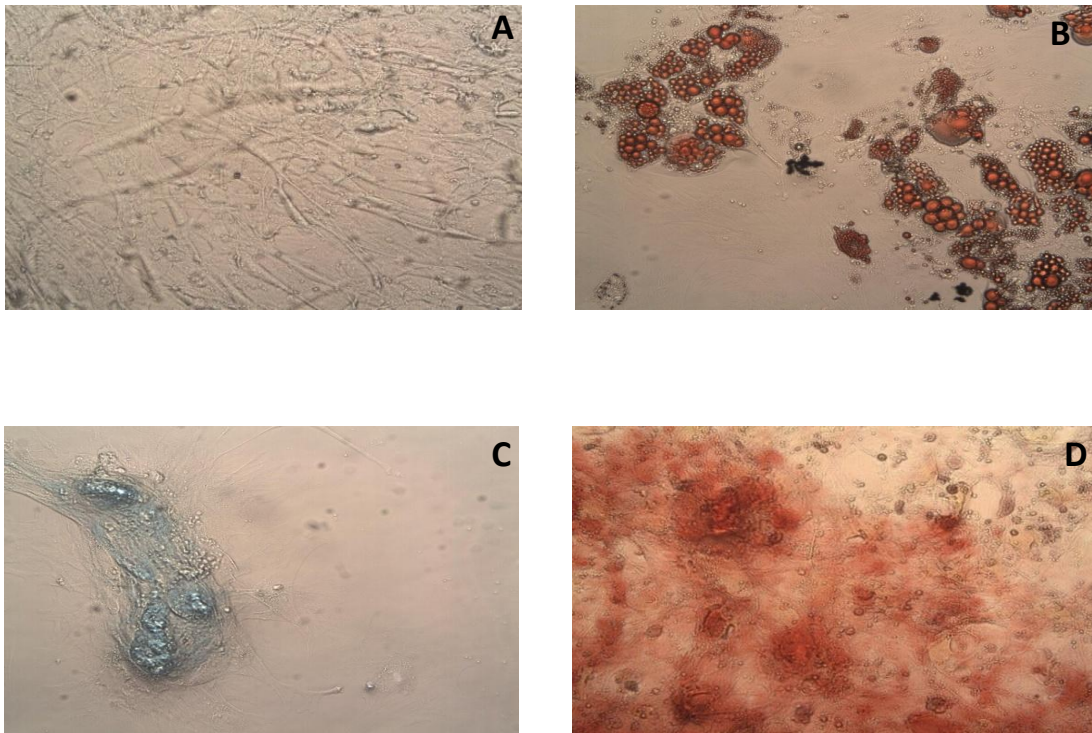


Figura6. MOTRM-10, P9. Diferenciação celular. Controle(A); Adipócitos(B); Condrcitos(C); Osteócitos(D).

A figura 8 representa um cariótipo masculino normal (MOTRM11) na terceira passagem, resultado observado em todos os outros indivíduos nesta mesma passagem. Em P9, as amostras MOTRM-12 e MOTRM-10 apresentaram cariótipo normal, enquanto em MOTRM-11 foi observado cariótipo poliploide (figura10). Nos casos MOTRM-8 e MOTRM-9 não foram possíveis às análises citogenéticas devido ao crescimento celular insatisfatório para obtenção de cromossomos metafásicos.

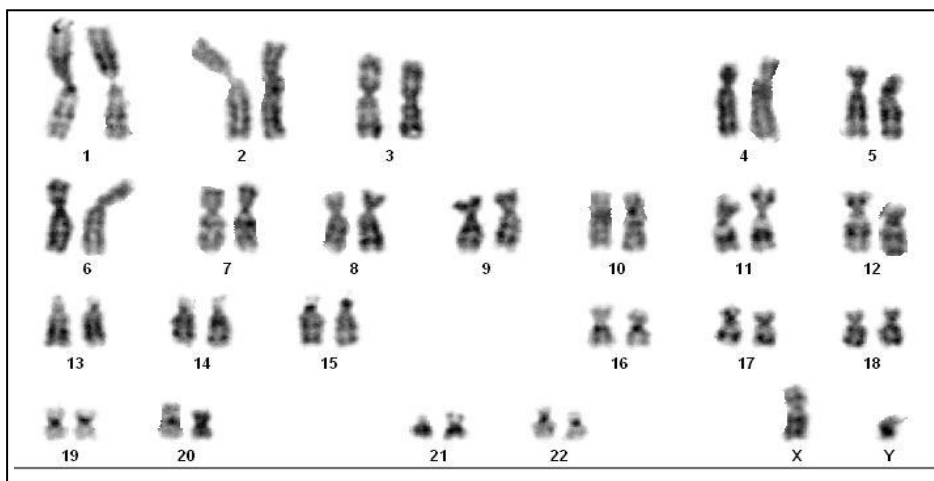


Figura8. MOTRM-11, P3. Cariótipo normal (46, XY).

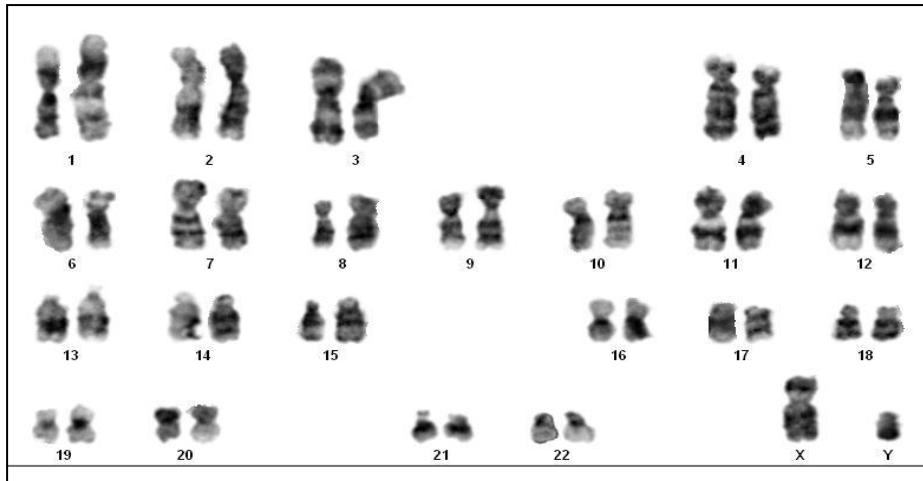


Figura9. MOTRM-12, P9. Cariótipo normal (46, XY).

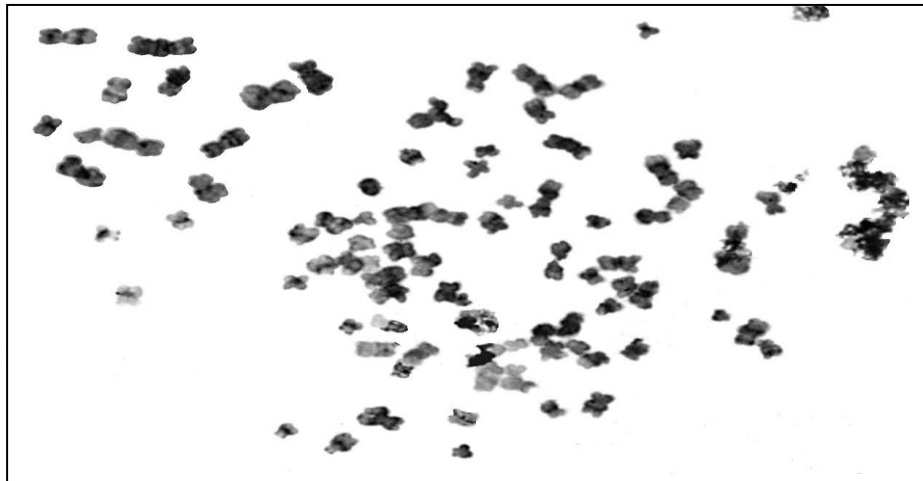


Figura10. MOTRM-11, P9. Cariótipo 81~91<4n, XXYY.

Não foi evidenciado diferença significativa entre as passagens inicial e tardia em relação aos genes STAT1, RUNX2, POU5F1, PPAR $\gamma$ , PLIN1 e ALPL pela análise por qRT-PCR (figura11). Além disso, também foi analisado a expressão dos genes SOX2, NANOG e hTERT, porém estes não foram detectados em ambos os grupos. Em MOTRM-9 não foi possível a realização desta técnica na passagem 9, devido a ausência de crescimento celular desta cultura a partir de P8.

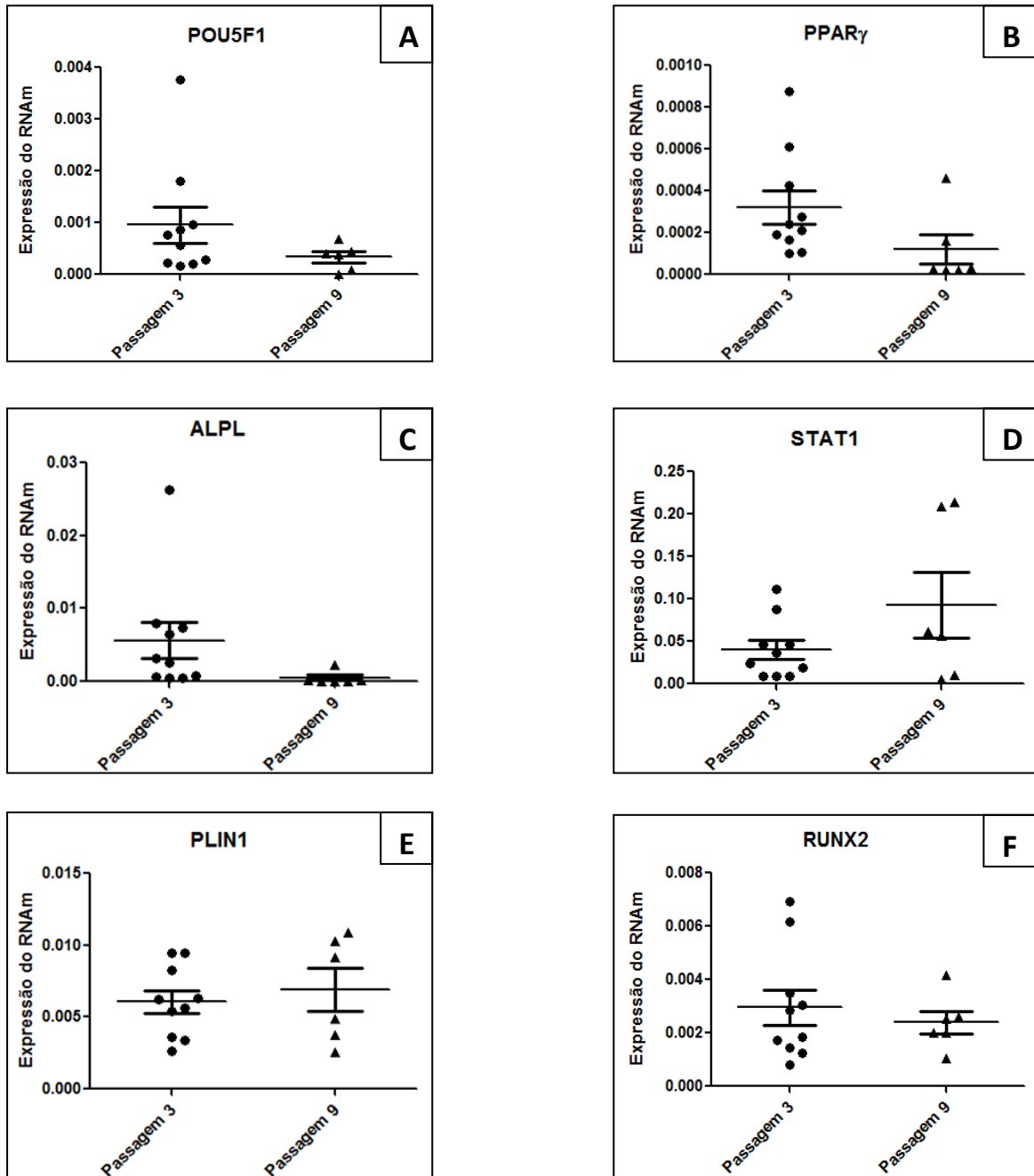


Figura11. Resultado do qRT-PCR nas passagens P3 e P9 de células-tronco mesenquimais. Fator de transcrição ligado a octâmero (A); Receptor nuclear  $\gamma$  (B); Fosfatase alcalina (C); Transdutor de sinal e ativador de transcrição1 (D); Proteína associada à partícula de lipídios (E); Fator de transcrição associado a osteogênese (F).

## 5. DISCUSSÃO

Devido a facilidade de isolamento, alta capacidade de proliferação e potencial de diferenciação celular as células-tronco mesenquimais apresentam-se hoje como alternativa promissora para terapia de diversas doenças como as neurodegenerativas, cardíacas, pulmonares e ósseas, (IYER *et al.*, 2009; JOYCE *et al.*, 2010; UNDALE *et al.*, 2009; WEN *et al.*, 2012). Portanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos acerca da sua manipulação *in vitro* e possíveis alterações genéticas ou funcionais torna-se necessária para garantir a segurança da utilização dessas células como ferramenta terapêutica.

Segundo a “*International Society for Cellular Therapy*” (ISCT), para classificar uma população de células como CTMs estas devem ser plásticas-aderentes, possuir a capacidade de diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica além de expressar marcação positiva para CD105, CD73 e CD90, e negativa para CD45, CD34, CD14, CD79a e CD19 (DOMINICI *et al.*, 2006). A presença dos marcadores de superfície celular foi avaliada através das técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo e, assim como descrito na literatura, as CTMs expressaram CD44 (glicoproteína de superfície celular envolvida na adesão celular), CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5'-nucleotidase) e CD90 (proteína ancorada em GPI) e não expressam os marcadores hematopoiéticos CD34 (marcador de célula-tronco hematopoiética primitiva), CD45 (tirosina fosfatase) e CD117 (receptor de citocina presente em célula-tronco hematopoiética), também estão ausentes os marcadores de células linfóides B CD19 e CD79a (LI *et al.*, 2011; SETHE *et al.*, 2006).

A caracterização celular pela análise da capacidade de diferenciação das CTMs em adipócitos, osteócitos e condrócitos foi evidenciada na passagem 3 em todas as amostras, sendo que a adipogênese e osteogênese ocorreram em média após 14 dias, enquanto a condrogênese foi observada após 21 dias. Um dos marcadores de senescência em CTMs *in vitro* é a alteração no potencial de diferenciação nas três linhagens celulares e, para o ISCT, com a similaridade entre os protocolos de diferenciação publicados e kits para realização deste ensaio disponíveis comercialmente, a comparação entre os resultados de distintos grupos tornou-se mais fácil. Ao analisar o potencial de diferenciação de CTMs de oito indivíduos entre P3 e P12, Wagner *et al.* em 2008 observaram uma redução no potencial adipogênico ao longo do estabelecimento da

senescência *in vitro*, com a formação mais efetiva de vacúolos de lipídios nas passagens iniciais. Além disso, foi descrito pelo grupo o aumento da propensão à diferenciação osteogênica com o cultivo prolongado destas células. No presente trabalho, as CTMs permaneceram capazes de se diferenciar nas três linhagens celulares na passagem tardia (P9), entretanto enquanto o período de diferenciação nas linhagens osteogênicas e condrogênicas foi mantido, o tempo de exposição ao meio de indução para a diferenciação em adipócitos aumentou para 20 dias. Apesar da ausência de quantificação da diferenciação, como efetuado por Wagner *et al.* em 2008, a alteração observada no tempo de formação de adipócitos, indica que na passagem tardia analisada, estas células já apresentam uma diminuição no potencial de diferenciação adipogênica.

Um dos primeiros marcadores de senescência replicativa em CTMs passíveis de observação são as modificações na morfologia celular. Essas células são caracterizadas por possuir morfologia fibroblastóide e é descrito na literatura que, com o cultivo prolongado, estas células apresentam morfologia alterada com forma achatada, maior tamanho, citoplasma granuloso e liberação de debris no meio de cultura (Li. *et al.*, 2011; NOH *et al.*, 2010). Bonab *et al.* (2006) cultivaram CTMs obtidas de onze indivíduos até P10 e demonstraram resultado semelhante, ressaltando que as alterações morfológicas ocorreram de forma gradual, pois foram observadas a partir de P7. No presente trabalho as CTMs também apresentaram alterações graduais na morfologia, identificadas a partir de P7, e na passagem tardia (P9) foi observado formato irregular, citoplasma granular, liberação de detritos e aumento de tamanho.

Nestas células, para que atingissem confluência, foi notado o aumento progressivo do tempo de cultivo entre as passagens, dado que em P3 as CTMs tardavam em média de 2 a 3 dias para atingir a confluência, enquanto em P9 este período foi em média de 5 a 6 dias, o que sugere um declínio da proliferação celular. Noh e colaboradores (2010) descreveram uma redução gradual na razão de crescimento de CTMs cultivadas *in vitro* até P12, associando esta observação ao “limite de Hayflick”, em que a célula sob cultivo diminui a capacidade de proliferação gradativamente, até parar a divisão celular.

Para verificar o comportamento genético das CTMs cultivadas em longo período podem ser utilizadas técnicas de análise citogenética. A estabilidade cromossômica destas células foi descrita por Bernado *et al.* em 2007, em que a partir da realização da cariotipagem em CTMs da MO de 10 indivíduos efetuadas em passagens variadas (P2-11), não foram encontrados cariótipos alterados. No presente trabalho todas as amostras

cultivadas apresentaram cariótipo normal composto por 46 cromossomos, sem evidências de alterações estruturais, na passagem inicial. Na passagem tardia a análise cromossômica foi obtida apenas em três das cinco amostras analisadas. MOTRM-8 e MOTRM-9 não apresentaram proliferação celular a partir de P8. Dos cariótipos analisados na passagem tardia duas amostras, MOTRM-10 e MOTRM-12, também não apresentaram alterações cromossômicas, enquanto que em MOTRM-11 foi observado poliploidia em 30% das células analisadas. A poliploidia é uma anomalia cromossômica caracterizada pela presença de três ou mais cópias do genoma por núcleo celular e ocorre quando os cromossomos se replicam, mas a fase de divisão nuclear/celular não é completada (RINGO, 2005). Esta anomalia pode conduzir a hiperexpressão gênica de genes relacionados ao desenvolvimento tumoral, representando um fator de risco para a neoplasia. Apesar de vários estudos evidenciarem a ausência de cariótipos alterados nesta passagem, é possível que no paciente analisado propriedades intrínsecas possam ter conduzido a formação da alteração encontrada. Dessa forma, a alteração encontrada em um único paciente impossibilita afirmar a instabilidade cromossômica nesta passagem. Tal dado apenas poderá ser confirmado com a expansão do estudo envolvendo um número maior de amostras, pacientes com características distintas e durante um período maior de tempo.

Para avaliar alterações no perfil de expressão gênica devido ao estabelecimento da senescência celular, foi realizado qRT-PCR nas passagens P3 e P9 para a avaliação dos genes SOX2, NANOG, hTERT, PLIN2, POU5F1, RUNX2, STAT1, PPAR $\gamma$  e ALPL. Como resultado foi possível observar uma diminuição na expressão do gene PPAR $\gamma$ , que está associado ao processo de adipogênese, entre as passagens inicial e tardia, o que pode estar relacionado com o aumento do período de indução da diferenciação adipogênica em P9, todavia os valores encontrados não apresentaram diferença significativa. Do mesmo modo os genes POU5F1, relacionado à auto-renovação e indiferenciação das células-tronco, PLIN2, associado ao armazenamento de lipídios, RUNX2 e ALPL, envolvidos com a osteogênese e STAT1, associado à viabilidade celular, não apresentaram diferença significativa entre P3 e P9, o que sugere a manutenção da capacidade de diferenciação celular na passagem tardia analisada. Wagner *et al.* em 2008, identificaram alterações no perfil de expressão gênica de CTMs entre P2 e P12. Dentre os genes com aumento de expressão estão a glicoproteína humana NMB (GPNMB) relacionada à diferenciação e função de osteoblastos e STAT1, ao passo que foi observado a diminuição da expressão

do ácido hialurônico sintetase 1 (HAS1) que medeia a expressão de componentes da matriz extracelular. A expressão do STAT1 não apresentou diferença significativa em cultivo prolongado, contudo é possível que a realização desta técnica em passagens mais elevadas exponha alterações no perfil gênico.

A expressão da transcriptase reversa da telomerase (hTERT) não foi observada em ambas passagens. Esta é a subunidade catalítica da enzima telomerase, responsável por catalisar a adição de nucleotídeos nas extremidades dos cromossomos denominadas regiões teloméricas. A ausência da telomerase em células-tronco é um dos mecanismos que desencadeiam a senescência celular replicativa, de modo que com o cultivo a longo prazo as células-tronco diminuem o comprimento da região telomérica e com a possibilidade do comprometimento da integridade cromossômica, há a ativação das vias p53 e p16<sup>INK4a</sup> (BONAB *et al.*, 2006; SHARPLESS; DEPINHO, 2004). Contudo a relação entre disfunção telomérica e ativação das vias de senescência ainda permanece controversa. Foi evidenciada também a ausência da expressão de SOX2 e NANOG nas CTMs analisada, o que pode estar relacionado à associação destes genes com a manutenção da pluripotência e autorenovação característicos de células-tronco embrionárias (ADACHI *et al.*, 2010; BOYER *et al.*, 2005).

Para obtenção de uma quantidade satisfatória de células e garantia da integridade destas para um transplante seguro aos pacientes, as CTMs necessitam de cultivo durante determinado período de tempo *in vitro*. Este trabalho, embora realizado com um número reduzido de amostras, sugere que quando cultivadas por período curto de tempo essas células não apresentam alterações. Contudo, o cultivo prolongado das CTMs é passível da ocorrência de alterações funcionais e genéticas relacionadas ao estado de senescência replicativa que podem comprometer o uso destas na terapia. Os dados fornecidos nesta análise colaboraram para uma melhor compreensão acerca do comportamento das CTMs cultivadas. Entretanto, faze-se necessário estudo mais abrangente envolvendo um maior número de indivíduos avaliados, a observação de outros marcadores relacionados com a senescência e em maior tempo de cultivo, para melhor esclarecimento do comportamento destas células *in vitro*.



## 6. CONCLUSÃO

O estudo de alguns marcadores relacionados à senescência replicativa em CTMs cultivadas por doze meses permitiu a compreensão do comportamento dessas células. Embora observadas alterações na morfologia celular e tempo de cultivo entre as passagens inicial e tardia, o potencial de diferenciação, o perfil de expressão gênica e a análise cromossômica não apresentaram modificações significativas. Este resultado suporta a proposta de utilização destas células em passagens iniciais para garantir a total integridade das células, permitindo a utilização segura e confiável de CTMs na pesquisa e terapia celular. Todavia estudos que analisem outros marcadores de senescência replicativa, com maior tempo de cultivo celular e maior grupo amostral, são imprescindíveis para a melhor compreensão do comportamento das CTMs *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K. *et al.* Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*, v. 15, p. 455-469.

ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1462 p.

ANDREU, G.P. *et al.* La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Rev.Cubana de Medicina*, v. 44, p. 1-2, 2005.

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

BERNARDO, M. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *American Association for Cancer Research Journals*, v. 67, p. 9142-9149, 2007.

BONAB, M.M. *et al.* Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biology*, 7: 14, 2006.

BOYER, L.A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, v. 122, p. 947-956, 2005.

BYDLOWSKI, S.P. *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematologia. e Hemoterapia*, v. 31, p. 25-35, 2009.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. *A célula: Uma abordagem molecular*. 3rd ed. São Paulo: Artmed, 2007. 736 p.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. *Experimental Gerontology*, v. 40, p. 926-930, 2005.

FLORES, I.; BLASCO, M.A. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Letters*, v. 584, p. 3826-3830, 2010.

FRIEDENSTEIN, A.J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.*, v. 2, p. 83-92, 1974.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, v. 25, p. 585-621, 1961.

ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F. ed. Karger Basel, p. 130, 2005.

IYER, S.S. *et al.* Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med.*, v. 51, p. 5-16, 2009.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. *Histologia e Biologia celular: Uma introdução à patologia*. 3ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 704 p.

LI, Z. *et al.* Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLos one*, v. 6, p. 1-8, 2011.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*, v. 174, p. 249-282, 2006.

NARITA, M. *et al.* Rb-Mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, v. 113, p. 703-716, 2003.

NOH, H.B. *et al.* The molecular signature of *in vitro* senescence in human mesenchymal stem cells. *Genes & Genomics*, v. 32, p. 87-93, 2010.

JANZEN, V. *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>INK4a</sup>. *Nature*, v. 443, p. 421-426, 2006.

JOYCE, N. *et al.* Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regenerative Medicine*, v.5, p. 933–946, 2010.

POTTEN, C.S.; LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties Lessons for and from the Crypt. *Development*, v. 110, p. 1001-1020, 1990.

RINGO, J. *Genética Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 390 p.

ROSS, S.E. *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, v. 289, p. 950–953, 2000.

SCHWINDT, T.T. *et al.* Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, v. 16, p. 13-19, 2005.

SETHE, S. *et al.* Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Research Reviews*, v. 5, p. 91-116, 2006.

SHARPLESS, N.E.; DEPINHO, R.A. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 113, n. 2, p. 160-168, 2004.

SHAY, J.W. *et al.* Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, v. 10, n. 7, p. 677-685, 2001.

STENDERUP, K. *et al.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, v. 33, p. 919-926, 2003.4

SYLVESTER, K.G.; LONGAKER, M.T. Stem cells: review and update. *Archives of Surgery*, v.139, p. 93-99, 2004.

UNDALE, A.H. *et al.* Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc.*, v. 84, p. 893-902, 2009.

WAGNER, W. *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS one*, v. 3, p. 1-12, 2008.

WAGNER, W. *et al.* Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS one*, v. 4, p. 1-13, 2009.

WEN, Z. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells for post-myocardial infarction cardiac repair: microRNAs as novel regulators. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 16, n. 4, p. 657-671, 2012.

WEXLER, S.A. *et al.* Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*, v. 121, p. 368–374, 2003.