

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
MARIANA ASSIS LEMOS
**INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE
TECIDO ADIPOSEO EM CÉLULAS DA LINHAGEM OSTEOGÊNICA**
Porto Alegre
2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO(CIP)

L557i Lemos, Mariana Assis

Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica / Mariana Assis Lemos. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

61 f.: gráf. il.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS. 2. CÉLULAS TRONCO ADULTAS. 3. TECIDO ADIPOSEO. 4. MEDICINA REGENERATIVA. 5. OSTEOGÊNESE. 6. DAG. 7. DEXAMETASONA. 8. ÁCIDO ASCÓRBICO. 9. BETAGLICEROLFOSFATO. 10. rhBMP-4. 11. PROTEÍNAS RECOMBINANTES. 12. PROTEÍNAS MORFOGÊNICAS ÓSSEAS. 13. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

C.D.D. 574.87

C.D.U. 611-018.4:576.322(043.2)

N.L.M. QU 325

PONTIFÍCIA UNIVERIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE

**INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE
TECIDO ADIPOSEO EM CÉLULAS DA LINHAGEM OSTEOGÊNICA**

Mariana Assis Lemos
(Bolsista CNPq)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado
Orientadora

Porto Alegre
2008

MARIANA ASSIS LEMOS

**INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS
DE TECIDO ADIPOSEO EM CÉLULAS DA LINHAGEM
OSTEOGÊNICA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA :

Dra. Ana Cristina Aramburu da Silva – PUCRS

Dr. Jeferson Braga Silva-PUCRS

Dra. Rosane Ligabue-PUCRS

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida!!!!!!

Aos meus pais, César e Maria da Graça por tudo que me proporcionam; “*Sem amor eu nada seria*”.

A toda minha família, em especial, ao meu irmão, minha cunhada e a minha avó, Guiomar, pela amizade e pelo carinho.

Agradeço a minha orientadora, Denise, pela imensa sabedoria e reconhecida competência como orientadora; sem ela esta dissertação não teria sido possível.

A Aline, Ana Paula e ao João, colegas e amigos, por terem compartilhados momentos de tristeza, de angústia e de felicidade, enfim pelo companheirismo durante todo esse tempo de convivência.

Aos demais colegas de laboratório por suas colaborações. Em especial, ao Christian Viezzer e ao Jeremiah Lubianca.

A Cassiana Viau, UFRGS, e ao Thiago, da patologia HSL pela ajuda na realização do trabalho.

Aos médicos Milton Paulo e Pedro Martins incluindo suas equipes por suas contribuições.

Ao Dr. João Antônio Pêgas Henriques por sua total colaboração no projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Vanessa e Ernesto pelo auxílio.

Aos pacientes do estudo por suas doações, sem esse ato não seria possível o estudo.

Ao CNPq por disponibilizar a oportunidade de realizar esse curso.

As minhas grandes amigas, Carla Pereira, Lídia Helena e Andrea Carelli pelo apoio tanto pessoal como profissional.

Muito Obrigado a todos!!!!!!!!!!!!

RESUMO

A aplicação de diferentes células-tronco na regeneração de tecidos lesionados ou na engenharia de tecidos tem recebido grande atenção. Devido às dificuldades práticas de obtenção de células-tronco embrionárias e considerando os aspectos éticos e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco adultas, principalmente aquelas derivadas do estroma da medula óssea. No entanto, estudos recentes comprovam que essa população celular também pode ser isolada do tecido adiposo (PLA) obtida através de lipoaspiração. Esse tipo de célula tem a característica de se diferenciar numa variedade de tecidos mesodérmicos, dentre eles o tecido ósseo. O processo de osteoindução é influenciado por vários fatores e consiste na indução de células-tronco mesenquimais indiferenciadas a formarem células osteoprogenitoras. Os fatores osteoindutores utilizados mais freqüentemente são a rhBMP-4 ou DAG (Dexametasona/ácido ascórbico/ β -glicerolfosfato). Este estudo teve como objetivo avaliar a adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo quando cultivadas em meio indutor específico, contendo rhBMP-4 ou DAG.

Células-tronco adultas foram obtidas do tecido adiposo de três pacientes pela técnica de lipossucção, realizada pelo Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS. Após tratamento com colagenase para dissociação do tecido, as células foram quantificadas, caracterizadas com relação aos marcadores de membrana celular e cultivadas em meio contendo rhBMP-4, DAG ou convencional (controle). As culturas foram avaliadas no 7^o, 14^o e 21^o dia após indução em meio específico. A expressão da fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina foram avaliadas pela técnica de RT-PCR nas culturas de células derivadas do tecido adiposo de dois pacientes. A expressão das proteínas osteopontina e osteocalcina foi determinada pela técnica do PCR em tempo real em uma cultura de células derivada de um paciente. Igualmente, nesta mesma cultura foram realizadas colorações para fosfatase alcalina e von Kossa para demonstrar a diferenciação das células-tronco mesenquimais (MSC) em células osteoblásticas pela detecção da transformação osteoblástica e mineralização da matriz.

O número médio de células tronco adultas derivadas de tecido adiposo foi de $1,2 \times 10^7$ /mL. A média da frequência de expressão dos marcadores CD34 e CD117 foram semelhantes, 0,73% e 0,72%, respectivamente, embora tenha ocorrido uma grande variação entre as amostras. Para os marcadores CD45 e CD105 a média das frequências foram de 1,17% e 1,57%, respectivamente. A frequência do CD105 foi mais elevada nas três amostras.

Este estudo mostrou que as células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo cultivadas, ou não em meio osteogênico aderem e proliferam em cultura, sofrem osteoindução e expressam proteínas marcadoras da linhagem osteogênica como a fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina. Células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo são capazes de realizar a deposição de matriz mineralizada somente quando cultivadas em meio contendo DAG.

Palavras chaves: célula-tronco mesenquimais, tecido adiposo, células osteoprogenitoras, osteoindução, rhBMP-4, DAG.

ABSTRACT

The stem cells have potential application to tissue regeneration or tissue engineering. Due to ethical and legal aspects alternative sources are being considered. Several researchers concentrate the studies on adult stem cells, mainly those derived of bone marrow stromal cells. Nevertheless, recent data proved that adult stem cells can also be isolated from adipose tissue (PLA) obtained by liposuction. These cells are able to differentiate into a diversity of mesodermal tissue and among them, bone tissue. The osteoinduction process depends on several factors and consists of mesenchymal stem cells differentiating into osteoprogenitor cells. Frequently, the osteoinduction culture media contains recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-4) or DAG (dexamethasone, ascorbate acid and β -glycerophosphate). This study aims to evaluate the adipose tissue derived stem cells adhesion, proliferation, differentiation into osteoblasts in vitro using either (rhBMP-4) or DAG .

Adult stem cells derived from adipose tissue were obtained from three human subjects by liposuction realized by Plastic Surgery Service (Hospital São Lucas-PUCRS). After tissue dissociation by collagenase treatment, the cells were quantified, characterized with regard to cell membrane markers, and cultured in media containing rhBMP-4 or DAG, and control (only standard medium). The cultures were evaluated in 7, 14 and 21 days after induction. The expression of alkaline phosphate, osteopontin and osteocalcin were evaluated by PCR standard technique in cultured cells derived from adipose tissue obtained from two subjects. The expression of osteopontin and osteocalcin in one culture was determined by Real Time PCR technique. Moreover, alkaline phosphatase and von Kossa staining was performed to demonstrate the differentiation into mature osteoblasts by matrix mineralization.

The average number of adult stem cells derived from adipose tissue was 1.2×10^7 /mL. The frequency of CD34 and CD117 markers were similar, 0.73% and 0.72% respectively. The frequency of CD105 was higher in the three samples.

This study showed that the adult stem cells derived from adipose tissue cultivated or not in osteogenic media adheres and proliferates. Also, we demonstrate

the presence of mature osteoblasts when cells were cultured in the presence of medium containing rhBMP-4 or DAG by the expression of osteogenic lineage markers such as alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin. Cells cultivated in media containing DAG have also shown deposition of bone matrix protein.

Key words: mesenchymal stem cell, adipose tissue, osteoprogenitor cells, osteoinduction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Padrão de expressão temporal de marcadores típicos da osteogênese.	14
Figura 2: Expressão relativa do gene que codifica a proteína osteocalcina, BGLAP.	30
Figura 3: Expressão relativa do gene que codifica a proteína osteopontina (SPP1).	30
Figura 4: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em sem meio DAG, controle, não sendo evidenciado a presença de matriz mineralizada pela coloração de von Kossa. (Aumento 100x).....	31
Figura 5: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em meio DAG evidenciando a presença de matriz mineralizada pela coloração de von Kossa.(Aumento 100x).	31
Figura 6: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em sem meio DAG, controle, não sendo evidenciando a presença de fosfatase alcalina. (Aumento 100x).....	32
Figura 7: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em meio DAG evidenciando a presença de fosfatase alcalina. (Aumento 100x).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipo, fonte e plasticidade de diferentes células-tronco	6
Tabela 2: Utilizações de terapêuticas de células-tronco*	9
Tabela 3: Condições de cultivo e técnicas de análise.	18
Tabela 4: Números de células e freqüência de expressão de marcadores de superfície celular.....	27
Tabela 5: Expressão da fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina, (OC), e osteopontina (OC) em células cultivadas em meio contendo, ou não, BMP-4. .	28

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALP	Fosfatase Alcalina
β -2M	Beta-2 microglobulina
BGLAP	Osteocalcina
zxBMP	Proteína morfogenética óssea
BMP-4	Proteína morfogenética óssea-4
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Graus centígrados
DAG	Dexametasona/ácido ascórbico/ β -glicerolfosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
D-MEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dnase	Deoxirribonuclease
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines
dT	Dideoximidina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio

FBS	Soro fetal bovino
<i>g</i>	Força gravitacional
GLA	Proteína óssea gama carboxi-glutâmica
H₂O	Água
kDa	Quilo-dalton (unidade de massa atômica)
M	Molar
rhBMP-4	Proteína morfogenética óssea- 4 recombinante humana
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MQ	MilliQ
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
OC	Osteocalcina
OP	Osteopontina
p/v	peso/volume
PBS	Salina tamponada com fosfato
PLA	<i>Processed lipo-aspirate</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
Rh	Recombinante humana
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease

RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
SPP1	Osteopontina ou sialoproteína I
TGF-β	Fator de crescimento e transformação-β
U	Unidade
USA/EUA	<i>United States of América</i> / Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
VK	von Kossa
μL	Microlitro
μM	Micromolar
®	Marca registrada
%	Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1	Introdução sobre células-tronco	6
2.1.1	Células-Tronco Mesenquimais	7
2.2	Terapia celular com células-tronco	8
2.3	Células Osteoprogenitoras	9
2.4	Osteoindução	11
2.4.1	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMP-4)	11
2.4.2	Meio de cultura para indução de células indiferenciadas em células da linhagem osteogênica	12
2.5	Marcadores da linhagem osteogênica	13
3	OBJETIVO	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Aspectos Bioéticos	17
4.2	Delineamento do estudo	17
4.3	Obtenções de células-tronco adultas do tecido adiposo	17
4.4	Dissociação do tecido adiposo para obtenção de células-tronco adultas	18
4.5	Caracterização das populações celulares	19
4.6	Culturas de células-tronco mesenquimais	19
4.7	Indução das células-tronco mesenquimais para diferenciação na linhagem osteogênica	20
4.7.1	Cultura de células-tronco mesenquimais na presença da proteína morfogenética óssea - 4 (BMP-4)	20
4.7.2	Cultura de células-tronco mesenquimais em meio osteogênico (DAG)	20
4.8	Extração do RNA total das células em cultura	21
4.8.1	Extração do RNA Total com o Kit Paris	21
4.8.2	Extração do RNA total com Trizol	22
4.9	Transcrição Reversa para obtenção do cDNA	23
4.10	RT-PCR	23
4.11	PCR em tempo real (qRT-PCR)	24
4.12	Análises citológica das células cultivadas em meio DAG	25
4.12.1	Fosfatase Alcalina	25
4.12.2	von Kossa	25
4.13	Análise estatística dos resultados	26
4.13.1	Citometria de fluxo	26
4.13.2	PCR em tempo real (qRT-PCR)	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Fenotipagem das células derivadas de tecido adiposo	27
5.2	Expressão das proteínas da linhagem osteogênica: fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina nas culturas celulares	28
5.3	Quantificação da expressão das proteínas da linhagem osteogênica em células cultivadas em meio DAG	29
5.4	Padrão citoquímico para fosfatase alcalina e cálcio extracelular em células cultivadas em meio DAG	30

6 DISCUSSÃO	33
PERSPECTIVAS.....	38
7 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas com células-tronco estão avançando o nosso conhecimento sobre como um organismo desenvolve-se a partir de uma única célula (blástula) e como as células saudáveis podem substituir as células danificadas em organismos adultos (1;2).

As células-tronco diferem das outras células do organismo por apresentarem as seguintes características: são células indiferenciadas, isto é, não especializadas, capazes de se multiplicar mantendo essa condição por longos períodos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Diante de estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais, podem sofrer divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo em que originam células precursoras com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produzem células indiferenciadas que repõem a população de células-tronco (3;4). Durante o desenvolvimento embrionário, as células aumentam em número e passam a se diferenciar em células-tronco pluripotentes, que irão dar origem as três camadas germinativas: ectoderma, endoderma e mesoderma (5).

O processo de substituição de células danificadas por células saudáveis é uma área de intensa pesquisa, tanto acadêmica quanto aplicada. Esta área da ciência, que é baseada no uso de células-tronco para tratamento de doenças, é conhecida com medicina regenerativa (6).

A grande diversidade de atividade das células-tronco em diferentes tecidos torna importante a compreensão dos mecanismos reguladores que controlam as suas duas principais propriedades: a auto-renovação e a diferenciação. Vários estudos têm mostrado a ação de fatores extrínsecos, tais como o ambiente, as interações célula-célula, as moléculas secretadas e a matriz extracelular e de fatores intrínsecos, como a expressão gênica e a atividade da telomerase como os responsáveis pelo controle da auto-renovação e da diferenciação (7).

São conhecidos como tipos principais de células-tronco: (a) as células-tronco embrionárias, derivadas da camada interna de células do blastocisto; (b) as células-tronco adultas que podem ser de cordão umbilical, sangue periférico, medula óssea e de outros tecidos, como tecido adiposo (4).

Do ponto de vista terapêutico, ou seja, sua aplicação na regeneração de tecidos lesionados ou na engenharia de tecidos, as diferentes células-tronco apresentam vantagens e desvantagens. Devido às dificuldades práticas de obtenção de células-tronco embrionárias e considerando os aspectos éticos e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco adultas, principalmente aquelas derivadas do estroma da medula óssea. Estudos recentes comprovam que essa população celular também pode ser isolada do tecido adiposo coletado através de lipoaspiração (7-9).

A terapia com células-tronco mesenquimais, um importante grupo de células-tronco adulta, é promissora para o tratamento de várias doenças degenerativas. A principal razão, em suporte a essa afirmação, decorre do fato de que células-tronco mesenquimais possuem relevante capacidade plástica, sendo capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo*, destacando-se a reparação cardiovascular, o tratamento de fibrose pulmonar, danos na medula e regeneração óssea e de cartilagem (10).

A perda de tecido músculo-esquelético cria um maior desafio para os ortopedistas e os cirurgiões plásticos. Novas tecnologias envolvendo a implantação de células e a engenharia de tecidos é o começo do desenvolvimento para a melhora da reparação óssea e de cartilagem. A célula ideal necessária para essa engenharia de tecidos deve ser imunocompatível e ter um potencial auto-regenerativo. Múltiplas linhagens de células-tronco, inclusive as células extraídas de tecido adiposo possuem essas características e apresentam potencial terapêutico para regeneração de tecidos (11).

Na medicina ortopédica há vários exemplos de como as células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas para a regeneração óssea e de cartilagem. Estes exemplos incluem a regeneração da coluna vertebral (12), a reparação óssea (13), assim como a reparação de defeitos em cartilagens (14;15) e tendões (16).

O processo de osteoindução é influenciado por vários fatores e consiste na indução de células-tronco indiferenciadas para formação de células osteoprogenitoras. A diferenciação osteogênica requer a presença de indutores, que incluem o β -glicerolfosfato, o ácido ascórbico e a dexametasona. Na presença destas substâncias as células mesenquimais adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar a fosfatase alcalina, a depositar matriz extracelular rica em

cálcio e certas proteínas, como por exemplo, a osteopontina e a osteocalcina (11;12;17).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) são fatores de crescimento com papel específico na proliferação e na diferenciação de células mesenquimais. Dentre as inúmeras BMPs já descritas, a BMP-4 está envolvida nos estágios iniciais da osteogênese (18;19).

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a diferenciação de células-tronco derivadas da medula óssea humana na linhagem osteogênica requer a presença de BMP-4 nos primeiros dias de cultura e que essas células, após 21 dias expressam proteínas específicas da linhagem osteogênica como a osteonectina, a osteocalcina e a osteopontina (20) .

As células-tronco adultas podem ser caracterizadas pelo emprego de anticorpos específicos para proteínas de membrana celular, características de populações celulares específicas, pela técnica de citometria de fluxo. Estudos descritos na literatura têm mostrado que entre as células da camada mononuclear obtida de medula óssea, de cordão umbilical e em outros tecidos existem tanto células-tronco hematopoiéticas quanto células-tronco mesenquimais. As células-tronco hematopoiéticas dão origem a todas as células do tecido sanguíneo, e possuem como proteína de membrana característica, o CD34. As células-tronco mesenquimais dão origem às células que irão formar os outros tecidos do organismo, e expressam em suas membranas os marcadores CD105 (endoglina) e CD117 (c-kit) (3;21;22). Assim, é possível selecionar as populações celulares específicas mais adequadas para a regeneração do tecido de interesse.

Os fatores extrínsecos envolvidos na proliferação e na diferenciação das células-tronco adultas derivadas de diversos tecidos do organismo como a medula óssea, o tecido adiposo e outros ainda não estão bem esclarecidos. Portanto, para que seja possível a utilização de células-tronco adultas de qualquer fonte é de fundamental importância que se avalie sua potencialidade com relação à capacidade de proliferação, viabilidade e capacidade de diferenciação. Sendo assim, a melhor definição de marcadores para subpopulações celulares e a padronização de métodos de expansão de células-tronco adultas ainda são necessários neste momento (23).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Introdução sobre células-tronco

A denominação de células-tronco está intimamente ligada à fase embrionária. Após a fecundação de um óvulo por um espermatozóide, essa única célula se transforma em todos os tecidos adultos, sendo assim, essa célula se divide formando células idênticas. Após essa fase precoce, embrionária, os diferentes grupos celulares vão adquirindo características especializadas e, ao mesmo tempo, estarão restringindo sua capacidade de diferenciação. Portanto, durante o desenvolvimento embrionário, a proliferação e a diferenciação celular criam um número crescente de células e tipos celulares (3;23;24).

As células-tronco são fundamentais, não somente para coordenar a formação dos órgãos, desde a fase embrionária até o indivíduo adulto, mas também pelo seu papel fundamental na regeneração e reparo dos tecidos (8). Inúmeros critérios propostos existem para definir células-tronco, as quais devem ser células indiferenciadas como a habilidade de proliferação pelo processo de auto-renovação e produção de inúmeras células funcionalmente diferenciadas e capazes de promover a regeneração dos tecidos lesionados (Tabela 1).

Tabela 1. Tipo, fonte e plasticidade de diferentes células-tronco

Tipo	Fonte	Tipo de células produzidas
Embrionária	Blastocisto, células germinativas primordiais	Todas as células
Neural	Cérebro	Neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, sanguíneas
Epitelial	Intestino, epiderme	Epiteliais, epidérmicas
Hematopoética	Medula óssea	Sanguíneas, endoteliais, hepáticas, musculares
Mesenquimal	Tecido adiposo/Medula óssea	Osteócitos, condrócitos, adipócitos, tenócitos, mioblastos, estromais

2.1.1 Células-Tronco Mesenquimais

O mesoderma origina todos os elementos do esqueleto. A habilidade que as células-tronco mesenquimais possuem de se disseminar e migrar, desde as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, entre as camadas ectodérmica e endodérmica, constitui o elemento-chave para todo o reparo tecidual em organismos adultos relacionados à derme, aos ossos e aos músculos (25). Logo, células-tronco mesenquimais (MSCs) têm a característica de se diferenciar numa variedade de tecidos .

Em adição, as MSCs são fáceis de serem isoladas e expandidas *in vitro*. E o seu potencial de diferenciação reflete o ambiente local (26). Elas adquirem características específicas dos tecidos, mas de acordo com os sinais que recebem, podem se diferenciar em células especializadas com fenótipos distintos de sua precursora (10).

Embora essas células manifestem um tempo finito de vida em cultura *in vitro* e aproximam-se da senescência muito mais rapidamente que as células-tronco embrionárias, técnicas atuais para a manutenção do fenótipo indiferenciada dessas células permite que elas cresçam em número suficiente para aplicação clínica. Em seres humanos os potenciais terapêuticos das células-tronco mesenquimais evitam e suplantam as questões éticas, morais e legais associadas ao uso das células-tronco embrionárias.

O tecido adiposo, assim como a medula óssea, é derivado do mesoderma embrionário e contém um estroma que é facilmente isolado, contendo uma população heterogênea de células estromais, sendo uma fonte alternativa que permite a obtenção de grandes quantidades, com anestesia local e mínimo desconforto. Células-tronco mesenquimais podem ser facilmente isoladas desse tecido lipoaspiração. A coleta deste material pode ser realizada com grande segurança, pois mais de 400 mil lipoaspirações são realizadas anualmente apenas nos Estados Unidos, e com baixo índice de complicações. Além da possibilidade de obtenção de grande quantidade de material, a concentração de células-tronco no tecido adiposo pode ser, até 500 vezes maior do que a encontrada na medula óssea, segundo alguns autores (7;9;27) .

2.2 Terapia celular com células-tronco

Desde o início do século XX, sabe-se que existem nos tecidos dos organismos adultos, células-tronco que são as precursoras das células diferenciadas: desta forma, o sangue regenera-se continuamente pela diferenciação das células-tronco hematopoiéticas contidas na medula óssea. A particularidade das células-tronco é que elas podem, ao mesmo tempo, multiplicar-se de forma idêntica, para restituir células-tronco, e diferenciar-se para produzir células especializadas.

As propriedades terapêuticas das células-tronco contidas nos tecidos dos organismos adultos já são utilizadas há alguns anos em duas indicações: coleta, durante um período de remissão, cultura e re-infusão das próprias células-tronco hematopoiéticas em pacientes com leucemia que foram colocados em aplasia celular por quimioterapia, e coleta, cultura e transplante de células-tronco da própria pele em grandes queimaduras (28).

Uma nova área da medicina vem sendo desenvolvida e abrange perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças crônico-degenerativas. É a chamada medicina regenerativa a qual consiste na utilização de células, fatores de proliferação e diferenciação celulares e biomateriais que permite que o próprio organismo repare os tecidos e órgãos lesados. Há relatos de que os tecidos adultos possuem células-tronco próprias residentes e que ocorre migração de células-tronco do sangue periférico para outros órgãos, como o coração. Igualmente, células já diferenciadas podem proliferar em resposta a agressões teciduais indicando que o processo de regeneração ocorre nestes tecidos, embora possa não ser eficiente o suficiente para levar à cura, dependendo do grau de dano tecidual que tenha ocorrido (29-33).

Com isso, o princípio fundamental da terapia com células-tronco resume-se em sua aplicação na restauração de tecidos lesados. Alguns exemplos do uso terapêutico das células-tronco mesenquimais foram relatados recentemente e têm um amplo espectro de indicações: cardiopatias, neoplasias, fibrose pulmonar, dano de medula espinhal e reparo ósseo e cartilaginoso (Tabela 2) (10).

Tabela 2: Utilizações de terapêuticas de células-tronco*.

Indicação	Fonte	Aplicação	Resultado
Infarto do miocárdio	Medula óssea AC133+	Injeção direta	Função aumentada
Osteogênese imperfeita	MSCs alogênicas	Infusão	Densa formação óssea
Defeitos em ossos longos	MSCs alogênicas	Arcabouço	Reparo ósseo aumentado
Leucodistrofia metacromática e síndrome de Hurler	MSCs alogênicas	Infusão	Significante melhora na velocidade da condução nervosa
Anemia aplástica idiopática severa	MSCs alogênicas	Infusão	Melhora estromal

*Adaptada de 10.

2.3 Células Osteoprogenitoras

A formação óssea dá-se através da ossificação intra-membranosa e ossificação endocondral. A ossificação intra-membranosa produz osteoblastos diretamente da condensação mesenquimal e ocorre em todos os ossos craniofaciais e na parte lateral das clavículas. Já na ossificação endocondral, as células mesenquimais diferenciam-se, primeiro, em condrócitos, formando um molde de cartilagem ocorrendo nos ossos longos dos membros superiores e inferiores, da região basal do esqueleto, das vértebras, costelas e parte medial das clavículas (34;35).

O osso possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de uma grande capacidade regenerativa, na qual todo o processo de formação ocorre a partir de uma integração biológica de processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação óssea. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual

óssea que vão determinar à capacidade de osteoindução, presença de sinais osteoindutores solúveis, a viabilidade das células-tronco mesenquimais indiferenciadas em responder, ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso além da produção de matriz extracelular adequada (36).

As células-tronco mesenquimais, quando em cultura e na presença de citocinas ativadoras de osso, sofrem osteopoiese, processo esse que envolve a proliferação e a maturação de células precursoras primitivas até a formação de osteoblastos funcionais, sendo que as células ósseas originadas das células-tronco mesenquimais comprometidas com esse fenômeno são as células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. Assim, três tipos celulares são importantes para a formação dos ossos: os pré-osteoblastos, os osteoblastos e os osteócitos. Esses morfotipos são, geralmente, considerados diferentes estágios de maturação de uma única linhagem celular originada da proliferação e da diferenciação de células osteoprogenitoras (37;38).

Os pré-osteoblastos representam um estágio de transição entre uma alta proliferação de células osteoprogenitoras e osteoblastos maduros, apresentando baixos níveis de proteínas ósseas, como a fosfatase alcalina, a osteonectina e a osteopontina, entre outras. Essas células fornecem importantes informações sobre resposta de fatores de crescimento, transdução de sinais e mineralização (39;40).

Os osteoblastos exibem as características típicas de células ativamente engajadas na síntese de proteínas e de cristais de hidroxapatita, a glicosilação e a secreção. Seus produtos específicos são colágenos tipo I, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. Eles também produzem uma forte reação citoquímica com a fosfatase alcalina, que é uma ectoenzima, uma proteína de superfície celular, que hidrolisa os ésteres monofosfato em pH alto, que desaparece quando as células estão embebidas na matriz, como os osteócitos. Além disso, os osteoblastos produzem fatores de crescimento, em particular, os membros da família de proteínas morfogenéticas ósseas, com atividades ósseas indutivas (39-41).

Sendo assim, a matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteína, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras), sendo todas elas sintetizadas pelos osteoblastos (40;42).

Os osteoblastos se diferenciam em osteócitos quando são aprisionados na matriz mineralizada que produzem, tornando-se incapazes de se dividir; e os osteoclastos, um outro tipo celular que não tem origem nas células osteoprogenitoras, são derivados dos precursores da linhagem hematopoiética e responsáveis pela reabsorção óssea (40;43).

2.4 Osteoindução

A osteoindução é o processo que sustenta a mitogênese de células-tronco mesenquimais induzindo à formação de células osteoprogenitoras com capacidade de formar novo osso. Diferentemente dos materiais osteocondutores, as substâncias osteoindutoras promovem a formação óssea em locais extra-esqueletais (44).

2.4.1 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMP-4)

As BMPs têm sido identificadas pela sua capacidade de indução óssea, estando envolvidas no desenvolvimento embrionário de várias células e tecidos. Os membros da família das BMPs desempenham um papel importante na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células ósseas, assim como na proliferação de osteoblastos, indução de proteínas da matriz óssea e síntese da fosfatase alcalina. Fatores locais e hormonais influenciam na diferenciação dos osteoblastos. No entanto, as BMPs guardam um interesse particular porque são produzidas por osteoblastos, além de possuírem a habilidade, em certas circunstâncias, de induzir formação óssea. São membros da superfamília do TGF- β (45-47).

A superfamília do TGF- β é uma família de fatores de crescimento multifuncionais que demonstra ser um dos mediadores da fisiologia celular normal, embriogênese tecidual, que participam de uma série de respostas associadas à inflamação e ao reparo tecidual. No corpo humano, sua principal fonte encontra-se na matriz óssea extracelular, sendo as plaquetas o segundo reservatório desse polipeptídeo. A superfamília do TGF- β tem grande atuação na atividade celular, incluindo o controle da proliferação e da expressão de diferentes fenótipos de vários

tipos de células específicas do esqueleto, dentre as quais se destacam as células-tronco mesenquimais precursoras de condrócitos, osteoblastos e osteoclastos (44).

A BMP-2B, também chamada de BMP-4, tem a capacidade de induzir a formação óssea *in vivo*, estimular a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina, além de sintetizar colágeno tipo I em células semelhantes a osteoblastos. A BMP-2 e a BMP-4 são altamente similares estruturalmente, apresentando 92% de homologia na seqüência de aminoácidos (47;48).

A BMP-4 tem múltiplos efeitos no fenótipo de um organismo. Por exemplo, em concentrações femtomolares é quimiotática para monócitos. Em altas concentrações, essa proteína é mitogênica e seus efeitos irão depender do estágio de diferenciação nas quais as células se encontram. Sua atuação nas células progenitoras é o de indução da proliferação já em osteoblastos maduros, a BMP-4 inibe a proliferação. Também, em altas concentrações, ela inicia e mantém a condrogênese e a osteogênese, além de fornecer um ambiente de suporte para a hematopoiese (49).

A BMP-4 desempenha um papel fundamental na embriogênese, induzindo a proliferação e a diferenciação de tecidos mesodérmicos. Esta proteína possui a capacidade de induzir células-tronco mesenquimais primitivas a formarem osso *in vitro* e *in vivo* por um processo direto ou endocondral. Sendo assim, ela possui um importante papel no controle da diferenciação e da proliferação de células osteoprogenitoras menos diferenciadas (células-tronco mesenquimais fibroblásticas e pré-osteoblastos) exercendo, portanto, menor influência na função de osteoblastos maduros (50).

2.4.2 Meio de cultura para indução de células indiferenciadas em células da linhagem osteogênica

Inúmeros experimentos descritos na literatura demonstram a diferenciação e indução osteogênica de células-tronco mesenquimais, com o uso de um meio de cultura padrão, suplementado com baixas concentrações de ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerolfosfato. Nestas condições, múltiplos marcadores osteogênicos celulares são expressos incluindo, por exemplo, a fosfatase alcalina, a osteopontina, a osteocalcina e o colágeno tipo I (5;7;9;11;27;51). O tratamento com

dexametasona, um glicocorticóide sintético, estimula a proliferação das células-tronco mesenquimais e dá um suporte na osteogênese. Apesar do efeito do aumento do número e tamanho dos nódulos, função e proliferação dos progenitores osteoblásticos precoce, resultando na integridade do tecido ósseo, pouco é conhecido sobre esse processo (52). Fosfatos orgânicos, assim como o β -glicerolfosfato, também dão suporte osteogênico por sua função na mineralização e modulação da atividade dos osteoblastos. Com isso, fosfatos livres podem induzir o mRNA e a expressão protéica, nesse tipo de célula óssea, exemplificado pela proteína osteopontina. Se uma fonte de fosfato orgânico, por exemplo, o β -glicerolfosfato, estiver presente, ocorre a formação de um conteúdo mineral, hidroxiapatita que é formado entre as fibras de colágeno. Outros suplementos, como o ácido ascórbico fosfatado, são freqüentemente utilizados na indução osteogênica, no envolvimento tardio do aumento da atividade da fosfatase alcalina e na promoção da produção da osteocalcina e osteopontina (17;53).

2.5 Marcadores da linhagem osteogênica

Durante a osteogênese, vários marcadores são induzidos de forma ordenada e seqüencial, embora ainda não tenham sido identificadas todas as etapas necessárias para esse processo de indução, pois os eventos ocorrem de forma contínua. A Figura 1 mostra os padrões de expressão temporal de marcadores típicos da osteogênese.

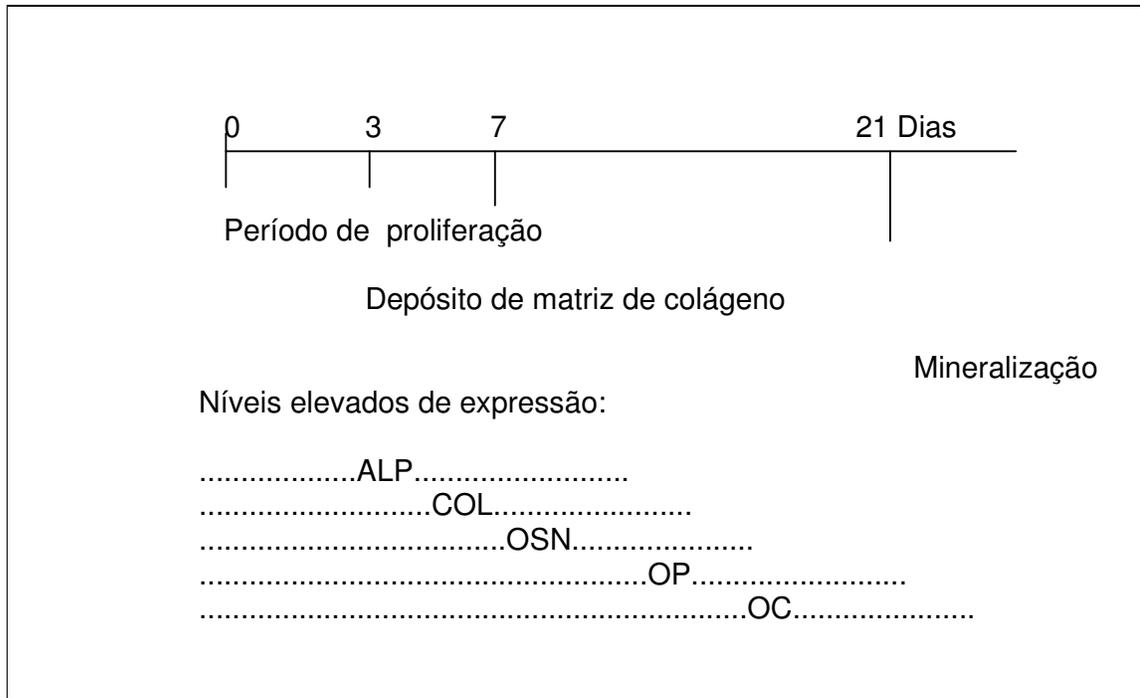


Figura 1: Padrão de expressão temporal de marcadores típicos da osteogênese. O processo de osteogênese pode ser dividido em três etapas: (a) proliferação, (b) deposição e maturação da matriz extracelular, e (c) mineralização. Os níveis de expressão aumentados dos genes contribuem para que os estágios de diferenciação ocorram em osteoblastos em períodos específicos durante o processo de osteogênese. A fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo I (COL) e osteonectina (OSN) são expressos em níveis elevados próximo ao final do período de proliferação e durante o período de depósito e maturação da matriz extracelular. Durante a mineralização ocorre a expressão dos genes que inclui a osteopontina (OP) e osteocalcina (OC). **Adaptada de 17.**

A osteopontina (SPP1) que é uma glicoproteína fosforilada pela matriz extracelular mineralizada dos osteoblastos durante o desenvolvimento ósseo, em que seu aumento é regulado pela vitamina D. Ela tem um papel crucial na larga escala de formação da hidroxiapatita (54).

Beck e colaboradores sugerem que a expressão da osteopontina é regulada fortemente em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular e que vários outros fatores, que não apenas o ácido ascórbico, estimulam a expressão dos transcritos para a osteopontina, como por exemplo, o TGF- β , ácido retinóico, endotelinas, BMPs e vitamina D (17).

A osteocalcina (BGLAP), também conhecida como ácido gama carboxi-glutâmico, é uma proteína de ligação com cálcio dependente de vitamina K.

Quimicamente, apresenta peso molecular de 6 kDa e 49 aminoácidos. Ela tem em sua conformação três ácidos gama carboxi (GLA) nas posições 17, 21 e 24 que são conhecidos como mediadores fortes da ligação com hidroxiapatita, fosfato de cálcio. Essa proteína é produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea, representando 20% das proteínas de matriz não colagenosa (5;55;56).

Portanto, fatores extrínsecos e intrínsecos estão relacionados com a diferenciação de células progenitoras de diferentes tipos de tecidos. Assim, fica claro que a identificação e a definição dos fatores envolvidos nestes processos são essenciais para permitir que fontes alternativas de células progenitoras possam ser utilizadas no reparo de tecidos.

3 OBJETIVO

Neste estudo, o tecido adiposo foi usado como fonte de células progenitoras e a osteogênese como alvo dos seguintes objetivos:

3.1 Verificar a aderência e a proliferação de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo.

3.2 Verificar a capacidade de diferenciação de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo quando cultivadas em meio indutor específico, contendo BMP-4 ou DAG.

3.3 Determinar o aparecimento de proteínas marcadoras da linhagem osteogênica: fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Bioéticos

O presente estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como com a diretriz número 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas envolvendo seres humanos (*Council for International Organizations of Medical Sciences*, CIOMS; 2002). Este estudo foi aprovado pela comissão científica do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS sob registro CEP: 05/02792.

4.2 Delineamento do estudo

Estudo transversal, experimental, descritivo.

4.3 Obtenções de células-tronco adultas do tecido adiposo.

O tecido adiposo foi obtido de três pacientes do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS, submetidos à lipoaspiração que assinaram o termo de consentimento informado. O material obtido foi colocado em uma seringa de 20 mL, em condição estéril, e transportado para o Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas-PUCRS para posterior extração das células. Na Tabela 3 estão representadas as técnicas empregadas para avaliação de cada uma das amostras deste estudo.

Tabela 3: Condições de cultivo e técnicas de análise.

Paciente	Cit.	Meio de cultura		Citoquímica		Expressão gênica	
		BMP-4	DAG	VK	AP	RT-PCR	qRT-PCR
1	X	X	-	-	-	X	-
2	X	X	-	-	-	X	-
3	X	-	X	X	X	-	X

(X): realizado; (-): não realizado; Cit.: citometria para caracterização das populações celulares; BMP-4: cultura em meio convencional (DMEM completo) contendo 4 ng/ml de proteína morfogenética óssea humana recombinante-4; DAG: cultura em meio convencional (DMEM completo) contendo 0,1µM de dexametasona, 50µM de ácido ascórbico, 10mM de β-glicerolfosfato; VK: coloração de von Kossa; AP: coloração para Fosfatase alcalina; RT-PCR: transcrição reversa seguida de PCR; QT-PCR: PCR em tempo real.

4.4 Dissociação do tecido adiposo para obtenção de células-tronco adultas

A gordura aspirada foi processada para a extração das células-tronco adultas. Então 20 mL de tecido adiposo foram divididos em dois tubos e lavados por 4 vezes com 40 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) para retirada das hemácias. A suspensão foi centrifugada a 403 ×g por 5 minutos. O tecido adiposo foi transferido para um novo tubo onde foram acrescentados 0,015% (p/v) de colagenase (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) diluída em DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) em um total de 50 mL. O tubo foi colocado em um agitador orbital e incubado a 37°C por 60 minutos até dissociação completa do tecido. A colagenase foi inativada com meio de cultura DMEM (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) contendo 10% (v/v) de FBS (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) e a solução foi dividida em dois tubos. As células foram centrifugadas a 403 × g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células precipitadas foram ressuspensas com 1 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) e contadas, em Câmara de Neubauer (*Loptik Labor*). Após a contagem das células, uma alíquota de 100 µL foi retirada para citometria de fluxo (item 4.5) e o restante, 900 µL, foram semeadas em placas de petry (item 4.6).

4.5 Caracterização das populações celulares

A caracterização das populações celulares presentes na suspensão de células foi realizada pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos anti-CD34, anti-CD45, anti-CD105 e anti-CD117 em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) em uma alíquota de 100 μ L dividido em dois tubos onde foi acrescentado 10 μ L de cada anticorpo (CD34/CD117 e CD45/CD105).

As amostras dos três pacientes foram incubadas a 4°C no escuro por 30 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas com DPBS e centrifugadas a 403 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando 50 μ L de volume final. A esse volume, foi acrescentado 1mL de paraformaldeído em DPBS e as amostras foram analisadas em até 48 horas.

4.6 Culturas de células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais são células aderentes em cultura e apresentam morfologia semelhante a fibroblastos. As células obtidas do tecido adiposo foram semeadas em uma densidade de 8×10^5 a 1×10^7 e cultivadas em placas de petry a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂, em meio D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*; Invitrogen, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Soral Biotecnologia, BR) inativado, 1% de estreptomicina-penicilina (10.000 g/mL, 10.000 μ /mL, Invitrogen, USA) e 0,1% de gentamicina (10 mg/mL, Invitrogen, USA). As culturas primárias foram observadas diariamente e o meio de cultura substituído a cada três dias para remoção das células do sobrenadante e manutenção das células aderentes. Quando a população celular atingia confluência de 90%, as células eram destacadas da superfície de cultura com uma solução de tripsina 1X (Gibco, USA) e incubada durante 10 minutos em estufa à 37°C seguido de centrifugação por 5 minutos a 240 x g.

As células foram ressuspensas em meio de cultura e transferidas para uma nova placa de petry, onde a cultura secundária (também chamada cultura após 1^o passagem) era submetida aos mesmos procedimentos de manutenção da cultura primária. Este procedimento foi repetido mais uma vez para obtenção de populações celulares de 3^o passagem, quando então eram induzidas, ou não, com os

respectivos meios. Para o paciente 3, mais duas placas de seis poços também foram semeadas com células nessa mesma condição para posterior análise imunocitoquímica (item 4.11).

4.7 Indução das células-tronco mesenquimais para diferenciação na linhagem osteogênica

4.7.1 Cultura de células-tronco mesenquimais na presença da proteína morfogenética óssea - 4 (BMP-4):

Para induzir a diferenciação na linhagem osteogênica, as células mesenquimais, após a 3^o passagem, foram cultivadas em placas de petry contendo 10 mL de meio D-MEM completo [10% de FBS, 1% de estreptomicina-penicilina (10.000 g/mL, 10.000u/ml, Invitrogen, USA), 0,1% de gentamicina (10mg/mL, Invitrogen, USA)] com 40 ng/mL de Proteína Morfogenética Óssea-4 Humana Recombinante (rhBMP-4), sendo que a proteína indutora foi mantida no meio de cultura até o terceiro dias após o início da indução. Células cultivadas sem adição de rhBMP-4 foram usadas como controle negativo para a indução.

As células foram mantidas em cultura por até 21 dias para verificação da expressão das proteínas de linhagem osteogênica.

4.7.2 Cultura de células-tronco mesenquimais em meio osteogênico (DAG)

As células-tronco mesenquimais foram cultivadas em meio osteogênico, composto por D-MEM completo acrescido de 0,1 µM de dexametasona, 50 µM de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato (DAG) após a 3^o passagem, por até 21 dias.

Três vezes por semana o meio de cultura (DAG) era substituído. Como controle negativo da indução, culturas de células foram mantidas em meio convencional (D-MEM completo) pelo mesmo período de tempo.

4.8 Extração do RNA total das células em cultura

A expressão do mRNA para as proteínas osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina foi detectada pela extração do RNA total seguida de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR) ou reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma dessas proteínas.

4.8.1 Extração do RNA Total com o Kit Paris

Sete, quatorze e vinte e um dias após o início da cultura, em meio indutor ou não, o RNA e as proteínas totais foram extraídos com o kit PARIS™ (Ambion Inc.).

As células em cultura foram dissociadas com uma solução de tripsina e lavadas com 1 mL de DPBS. Em seguida foi adicionado 300 µL de *Cell Disruption Buffer* (Ambion Inc.) para rompimento da membrana celular e nuclear e extravasamento do material genético e citoplasmático. Metade da solução contendo as células lisadas foi utilizada para obtenção das proteínas totais e a outra parte para a obtenção do RNA total. Para a extração do RNA, a amostra foi colocada em uma coluna contendo uma resina de sílica onde os ácidos nucleicos ficam aderidos. Após sucessivas lavagens com tampão, os ácidos nucleicos foram eluídos com *Elution Solution*, e a amostra tratada com 1 µL de Desoxirribonuclease I (Dnase I, Invitrogen, USA), para evitar uma possível contaminação com DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxirribonuclease I (DNase I 124 U/µL, Invitrogen, USA), a qual cliva o DNA de fitas simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato; as amostras foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a enzima foi inativada pela adição de 1 µL de 25 mM de EDTA e incubadas, por 10 minutos à 65°C e 1 µL de inibidor de Rnase (40 U/µL; Invitrogen, USA). Assim, os 20 µL de cada extração de RNA total foram digeridos com 10 U da enzima em um volume final de 23 µL.

Após a extração, o RNA total foi analisado em gel de agarose, 1,5% contendo brometo de etídio (EtBr), e a quantificação foi verificada por espectrofotometria em

comprimento de onda à 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA foi determinada utilizando-se a razão (A260/A280).

4.8.2 Extração do RNA total com Trizol

O RNA total foi isolado, empregando-se uma solução de TRIZOL LS Reagent (Invitrogen, USA). As células foram lavadas uma vez com 1 mL de DPBS. Após, foi adicionado 1 mL de TRIZOL LS (Invitrogen, USA) e as células foram incubadas por 7 minutos no gelo para destruição das membranas celular e nuclear e liberação dos ácidos nucléicos. Após o período de incubação, as suspensões foram retiradas da placa de cultura e transferidas para um tubo Eppendorf seguida da adição de 200 μ L/tubo de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, incubadas por 3 minutos no gelo e centrifugadas (Eppendorf 5417R, USA) a 15.300 x *g* por 15 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, o sobrenadante (fase aquosa e incolor) foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico gelado e incubado por 10 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Os precipitados foram lavados com 500 μ L de etanol 75% gelado e centrifugados a 15.300 x *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e os tubos permaneceram à temperatura ambiente por, aproximadamente, 30 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 20 μ L de H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1%, Invitrogen, USA) e com 1 μ L de inibidor de RNase (40 U/ μ L; Invitrogen, USA). Para evitar uma possível contaminação com DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxirribonuclease I (DNase I 124 U/ μ L, Invitrogen, USA), a qual cliva o DNA de fitas simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. As amostras foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a enzima foi inativada pela adição de 1 μ L de 25 mM de EDTA e incubadas, por 10 minutos à 65°C. Assim, os 20 μ L de cada extração de RNA total foram digeridos com 10 U da enzima em um volume final de 23 μ L.

A integridade do RNA total extraído das amostras foi analisada em gel de agarose 1,5%, após eletroforese em tampão TAE, contendo brometo de etídio (EtBr). A quantificação foi verificada por espectrofotometria em comprimento de

onda de 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA foi determinada utilizando-se a razão (A260/A280).

4.9 Transcrição Reversa para obtenção do cDNA

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, procedeu-se uma reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se a enzima Superscript II e como oligonucleotídeos iniciadores, o oligo-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, USA). Para cada reação utilizaram-se 22 µL da extração de RNA total, 0,5 µL da enzima Superscript II (200 U/µl; Invitrogen, USA), 0,2 µL de oligos-dT₁₂₋₁₈, 4,5 µL de DTT (0,1M; Invitrogen, USA), 4,5 µL de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 9 µL de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA), e H₂O-MQ até completar 45 µL de solução de reação. As reações foram incubadas no termociclador (Peltier Thermocycler, MJ Research, USA) e submetidas ao seguinte programa: 10 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C, e 3 minutos a 99°C. Após o término da transcrição reversa, 5 U de inibidor de ribonuclease H (2 U/µl; Invitrogen, USA) foram adicionadas a cada tubo e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso.

4.10 RT-PCR

O produto da PCR para a fosfatase alcalina é um fragmento de 263 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores direto 5´ GAC CCT TGA CCC CCA CAA T 3´ e reverso 5´ GCT CGT ACT GCA TGT CCC CT 3´. O produto da PCR para a osteopontina é um fragmento de 313 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores direto 5´ CAT CTC AGA AGC AGA ATC TCC 3´ e reverso 5´ CCA TAA ACC ACA CTA TCA CCT C 3´. O produto da PCR para a osteocalcina é um fragmento de 405 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores direto 5´ CGC AGC CAC CGA GAC ACC AT 3´ e reverso 5´ GGG CAA GGG CAA GGG GAA GA 3´.

A Reação em Cadeia da Polimerase foi realizada no termociclador MJ Research PTC-200 com a adição dos seguintes reagentes em um volume total de 50 µL para cada amostra: 0,5µL do cDNA correspondente a cada amostra, 1µL de

dNTPs, 2µL de primer, 5µL de solução tampão 10x, 2Ml de MgCl₂, 0,5 µL de Taq DNA polimerase e água MilliQ para completar o volume da reação. As condições para a amplificação foi um ciclo inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94° C por 30 segundos, 55° C por 45 segundos e 72° C por 1 minuto (desnaturação, anelamento, e extensão). Um ciclo final a 72° C por 10 minutos foi empregado para a extensão final dos amplicons.

Os produtos da PCR foram misturados a uma solução de azul de bromofenol, glicerol, e água (tampão 6x) e submetido à eletroforese em gel de agarose 2% contendo Brometo de Etídio (EtBr), com tampão TAE 1x e, após, visualizados sob luz ultravioleta.

4.11 PCR em tempo real (qRT-PCR)

A expressão dos transcritos de RNA (mRNA) para as proteínas da linhagem osteogênica, osteopontina e osteocalcina foi determinada pela técnica da PCR em tempo real usando o termociclador ABI Prisma 7500 Sequence Detection System® (SDS) (Applied Biosystems). A amplificação foi feita com 20 ng de cDNA usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) numa reação total de 25 µL. Cada amostra foi analisada em triplicatas. Esta análise foi realizada com células cultivadas em meio DAG.

As condições da qRT-PCR foram: 94 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 60 °C por 35 segundos. No estágio final, 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos para determinar a curva de dissociação do produto amplificado.

Os dados ópticos foram coletados durante a etapa de anelamento e a curva de dissociação foi gerada ao final de cada qRT-PCR a fim de assegurar a uniformidade da reação.

Os resultados foram analisados usando o sistema de detecção de seqüência (SDS), *software* (Applied Biosystems).

A β₂-microglobulina (β-2M) foi selecionada como gene de referência baseado em experimentos preliminares indicando uma melhor estabilidade de expressão quando comparada com a expressão do gene da β-actina. Os genes da osteocalcina (BGLAP) e da osteopontina (SPP1) foram os genes investigados.

Para a mensuração, o valor do ciclo limiar, Ct, foi determinado pelo termociclador. Os valores de Ct dos genes de interesse, osteocalcina (BGLAP) e osteopontina (SPP1) foram normalizados para o gene da β_2 -microglobulina. Os resultados foram analisados usando o método limiar crítico comparativo, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (57;58) foram expressos em comparação com as células não tratadas.

4.12 Análises citológica das células cultivadas em meio DAG

A coloração para Fosfatase Alcalina (ALP) e von Kossa (VK) foi realizada em placas de 6 poços, em triplicatas, compreendendo 3 culturas controles e 3 culturas induzidas (DAG), após o vigésimo primeiro dia para verificar a diferenciação osteogênica das células extraídas do tecido adiposo.

Essas colorações permitem avaliar a transformação osteoblástica através da detecção da produção de fosfatase alcalina e da calcificação da matriz extracelular (von Kossa), pois o fenótipo osteoblástico pode ser demonstrado pela deposição de matriz mineralizada. As células foram observadas em microscópio de campo invertido Axiovert 25 (Zeiss, Germany).

4.12.1 Fosfatase Alcalina

As culturas foram lavadas com DPBS e incubadas com solução a 1% de Fosfatase Alcalina (1% de fosfatase naphthol, 1 mg/mL de Fast Blue RR) a 37°C por 2 horas seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e incubação com formaldeído por 10 minutos.

4.12.2 von Kossa

As culturas foram incubadas em solução contendo 2% de nitrato de prata por 60 minutos sob luz UV. Após esse período as culturas foram lavadas com H₂O destilada e neutralizada com uma solução contendo 2% de tiosulfato de sódio.

4.13 Análise estatística dos resultados

4.13.1 Citometria de fluxo

Os valores obtidos de cada paciente pela técnica de citometria de fluxo foram empregados média e desvio padrão respectivamente.

4.13.2 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Na expressão quantitativa das proteínas, foi aplicado a análise de variância (ANOVA), teste múltiplo comparativo Bonferroni's.

5 RESULTADOS

5.1 Fenotipagem das células derivadas de tecido adiposo

As populações celulares presentes na suspensão de células, utilizadas para a cultura celular, foram caracterizadas pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos marcados com fluoróforos compatíveis para análise em duplas. A Tabela 4 apresenta o número de células e a frequência de expressão dos marcadores de superfície celular investigados neste estudo, nas amostras obtidas de três pacientes.

Tabela 4: Números de células e frequência de expressão de marcadores de superfície celular.

Paciente	nº céls	CD34	CD117	CD34/CD117	CD45	CD105	CD45/105
1	1,2X10 ⁷	0,09	1,15	6,91	1,48	1,96	8,03
2	1,4X10 ⁷	1,48	0,68	3,47	1,79	2,17	6,27
3	1,0X10 ⁷	0,63	0,33	5,27	0,24	0,57	4,50
$\bar{x} \pm d.p.$	1,2±0,2	0,73±0,49	0,72±0,29	5,21±1,17	1,17±0,62	1,57±0,66	6,27±1,18

nº céls: número de células por mL; $\bar{x} \pm d.p.$: média±desvio padrão.

O número médio de células foi de $1,2 \times 10^7$ /mL. A média da frequência de expressão dos marcadores CD34 e CD117 foram semelhantes, 0,73% e 0,72%, respectivamente, embora tenha ocorrido uma grande variação entre as amostras. Para os marcadores CD45 e CD105 a média das frequências foi de 1,17% e 1,57%, respectivamente. A frequência do CD105 foi mais elevada nas três amostras de células mononucleares. Com relação à dupla marcação para o CD34/CD117, as células obtidas do paciente 1 apresentaram quase o dobro da frequência observada nas células derivadas do paciente 2 e a frequência obtida para as células do paciente 1 com relação a frequência obtida para as células do paciente 3 apresentou uma diferença menor. Com relação à dupla marcação para o CD45/CD105, houve uma maior diferença na frequência observada entre as células obtidas do paciente 1 em comparação com as células obtidas do paciente 3, 8,03 e 4,50, respectivamente.

5.2 Expressão das proteínas da linhagem osteogênica: fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina nas culturas celulares

A diferenciação celular foi avaliada pela detecção da expressão das proteínas: fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina nas células cultivadas em meio DMEM contendo, ou não, BMP-4. Essa avaliação foi realizada pela detecção indireta dos mRNAs para estas proteínas, seguidas da transcrição reversa e síntese de cDNAs.

Na Tabela 5 estão descritos os resultados observados nas culturas de células obtidas de tecido adiposo dos pacientes 1 e 2.

Tabela 5: Expressão da fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina, (OC), e osteopontina (OP) em células cultivadas em meio contendo, ou não, BMP-4.

BMP-4	DPI	PACIENTE I			PACIENTE II		
		ALP	OC	OP	ALP	OC	OP
Sem	7 ^o	-	-	-	-	-	-
	14 ^o	+	-	+	-	-	+
	21 ^o	-	-	-	+	-	-
Com	7 ^o	-	-	+	-	-	-
	14 ^o	+	+	-	-	+	+
	21 ^o	-	-	+	-	+	+

Sem, com: meio sem ou com BMP-4, respectivamente; DPI: dias de cultura após indução, ALP: fosfatase alcalina; OC: osteocalcina; OP: osteopontina; (+): positivo; (-): negativo.

Nas células cultivadas em meio sem indução, a presença da osteopontina foi detectada somente no 14^o dia de cultura nas duas amostras. A fosfatase alcalina foi detectada, no 14^o dia, na cultura de células derivadas do paciente 1 e somente no 21^o dia de cultura nas células derivadas do paciente 2. Não foi detectada a presença de transcritos de mRNA para osteocalcina nas células cultivadas em meio DMEM completo sem adição de BMP-4.

Nas culturas com meio contendo a BMP-4, a fosfatase alcalina esteve presente apenas na cultura de células derivadas do paciente 1 e, somente, no 14^o

dia. O mesmo foi observado para a proteína osteocalcina, nas culturas deste mesmo paciente. Nesta cultura, a osteopontina foi detectada nos dias 7º e 21º, estando ausente no 14º dia após indução com BMP-4. Nas culturas de células derivadas do paciente 2, tanto a osteocalcina quanto a osteopontina foi detectada no 14º e 21º dia após indução. Não foi observada a expressão de fosfatase alcalina nas culturas de células derivadas do paciente 2.

5.3 Quantificação da expressão das proteínas da linhagem osteogênica em células cultivadas em meio DAG

Os genes BGLAP, que codifica a proteína osteocalcina e SPP1, que codifica a proteína osteopontina, expressas durante a osteogênese, foram avaliados com relação a sua expressão quantitativa pela técnica da PCR em tempo real. O gene endógeno, constitutivo da β_2 -microglobulina foi quantificado e seus níveis empregados para normalização dos resultados. Esta avaliação foi realizada em células derivadas do paciente 3 cultivadas em meio DMEM na presença ou não de DAG (dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato).

A expressão do gene que codifica a proteína osteocalcina, Figura 2, BGLAP foi harmônica, com sua maior expressão no 7º dia em comparação, com sua expressão posterior em cultura (14º e 21º dia).

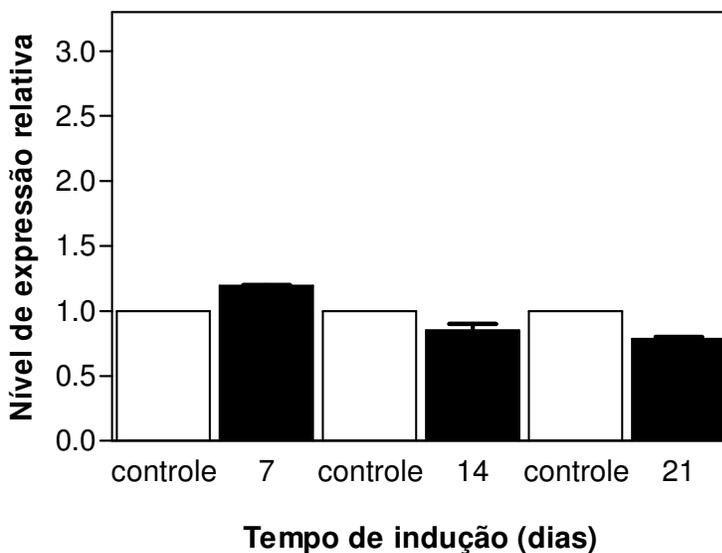


Figura 2: Expressão relativa do gene que codifica a proteína osteocalcina, BGLAP. A expressão do gene BGLAP foi quantificada por PCR em tempo real em cultura de células derivadas do paciente 3, em meio DMEM com ou sem DAG por três semanas. A expressão relativa do gene foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno β -2M, através das culturas de células induzidas e dos seus respectivos controles, sendo um controle para cada dia.

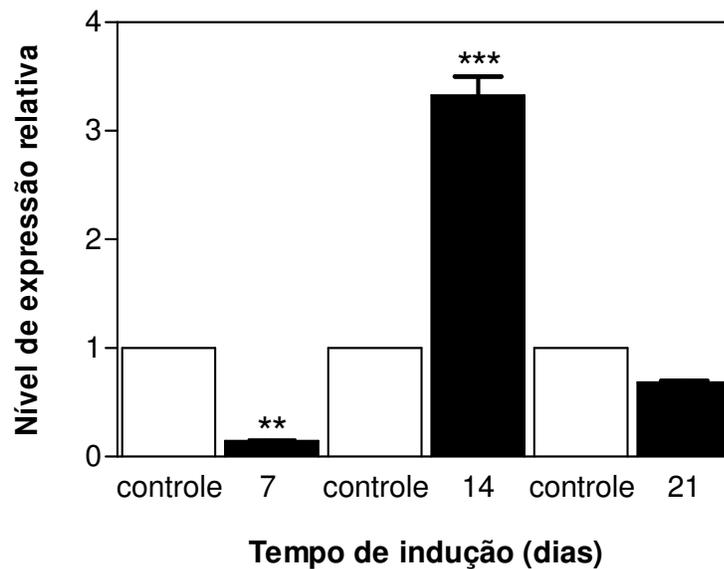


Figura 3: Expressão relativa do gene que codifica a proteína osteopontina (SPP1). A expressão do gene SPP1 foi quantificada por PCR em tempo real em cultura de células derivadas do paciente 3, em meio DMEM com ou sem DAG por três semanas. A expressão relativa do gene foi normalizada em relação ao gene endógeno β -2M, através das culturas de células induzidas e dos seus respectivos controles, sendo um controle para cada dia.

A expressão do gene que codifica a proteína osteopontina (SPP1), Figura 3, foi muito reduzida no 7º dia ($p < 0,01$), extremamente elevada no 14º dia ($p < 0,001$), decrescendo no 21º dia.

5.4 Padrão citoquímico para fosfatase alcalina e cálcio extracelular em células cultivadas em meio DAG.

Após 21 dias em cultura, as células do paciente 3 foram submetidas as colorações por fosfatase alcalina e von Kossa para a certificação de diferenciação osteogênica. A presença de matriz mineralizada também foi observada pela

deposição de nitrato de prata (pontos escuros) como mostra a Figura 5. Foi demonstrada a presença da fosfatase alcalina como pode ser observado na Figura 7, onde várias células apresentam uma coloração escura.

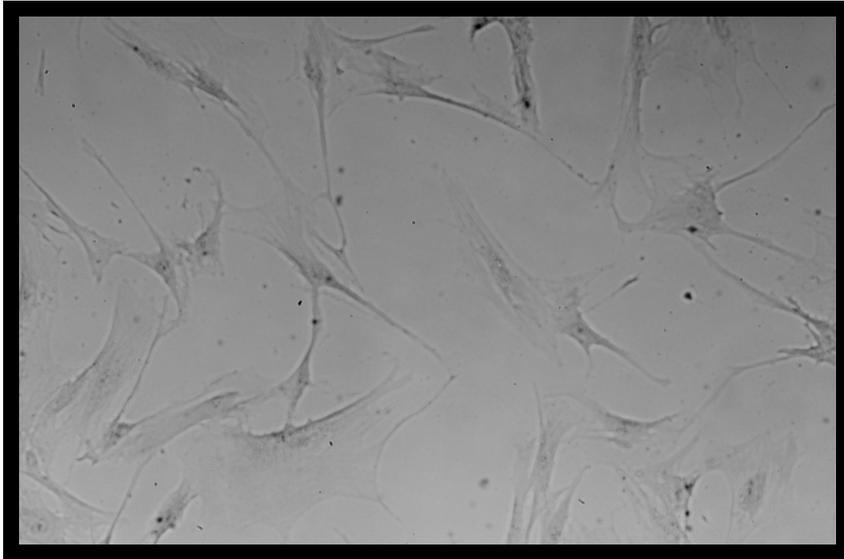


Figura 4: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em sem meio DAG, controle, não sendo evidenciado a presença de matriz mineralizada pela coloração de von Kossa. (Aumento 100x).

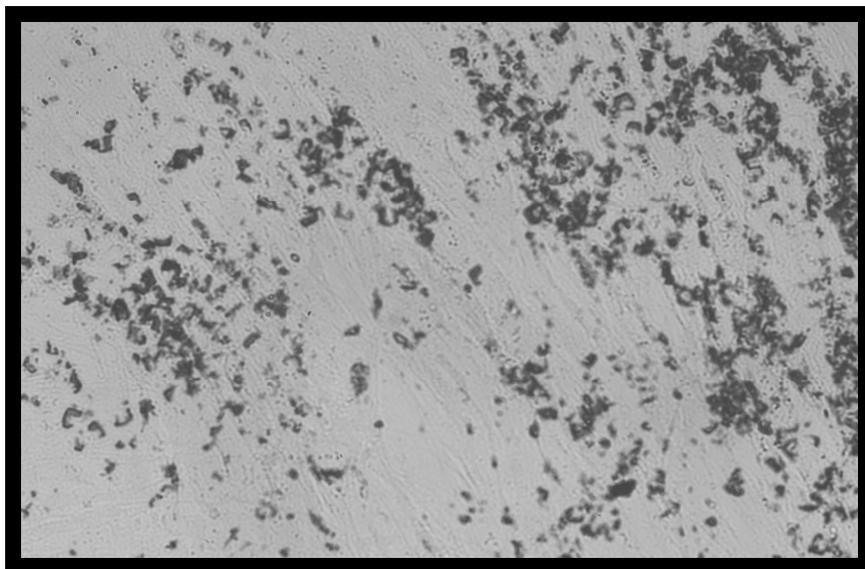


Figura 5: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em meio DAG evidenciando a presença de matriz mineralizada pela coloração de von Kossa.(Aumento 100x).

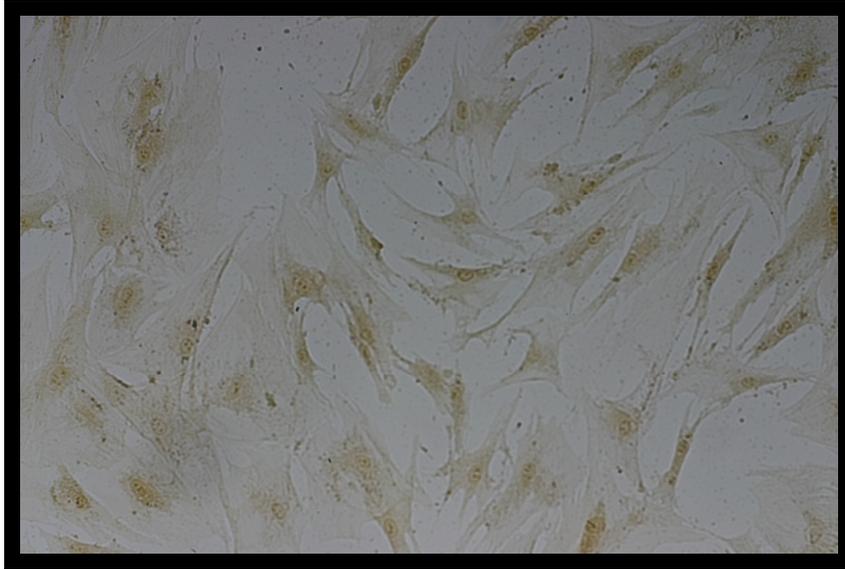


Figura 6: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias sem meio DAG, controle, não sendo evidenciando a presença de fosfatase alcalina. (Aumento 100x).

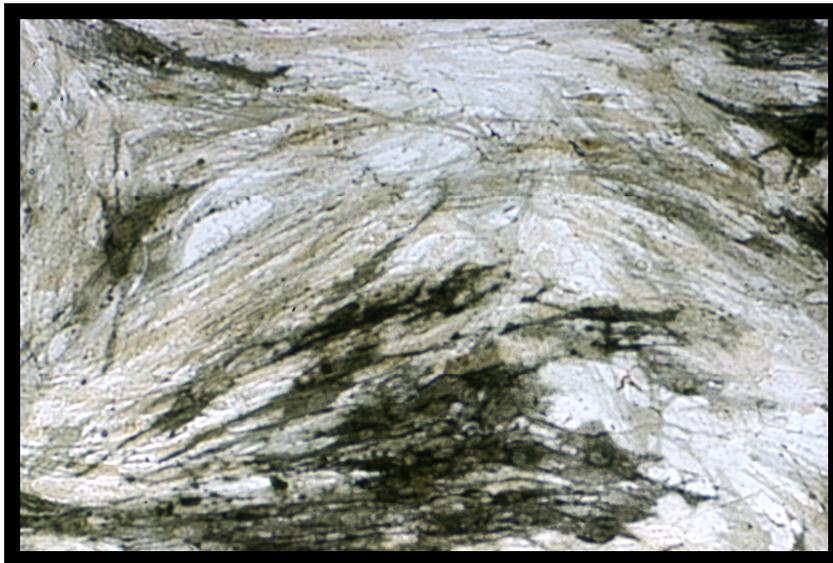


Figura 7: Fotomicrografia de células derivadas do paciente 3 cultivadas por 21 dias em meio DAG evidenciando a presença de fosfatase alcalina. (Aumento 100x).

6 DISCUSSÃO

Estratégias de tratamentos baseados no uso de células-tronco têm o potencial de revolucionar a prática da medicina, tendo em vista a possibilidade de oferecer opções terapêuticas para pacientes com doenças graves (3).

A regeneração óssea através da engenharia de tecidos com transplante autógeno de células é um dos mais promissores conceitos sendo desenvolvido, já que poderão eliminar uma área de morbidade devido à retirada de enxerto autógeno, bem como reduzir o risco de rejeição do organismo inerente aos enxertos alógenos, alográficos e xenográficos (25).

A falta de critérios comuns e padrões universais para o uso de MSC têm impedido muito a promoção do progresso. Existe uma necessidade urgente para a identificação e caracterização dessas células. Até agosto de 2006, não havia um consenso em relação aos marcadores moleculares que deveriam ser utilizados para o controle da qualidade das preparações celulares. A questão foi resolvida pela Sociedade Internacional de Terapia Celular que definiu que as célula-tronco mesenquimais devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não devem conter marcadores hematopoiético como o CD45, CD34, CD14 ou CD11b (23;59).

Os resultados obtidos nesta investigação, com relação aos marcadores expressos na superfície das células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo, estão de acordo com essa premissa e com outros estudos descritos na literatura, pois, foi observada uma maior freqüência de expressão do CD105, indicando a presença de um maior número células precursoras mesenquimais, as quais têm um papel fundamental na osteogênese (9;23;59;60).

As células-tronco mesenquimais têm sido descritas como células multipotentes que podem se replicar como células indiferenciadas e tem ainda a capacidade de se diferenciar em células da linhagem mesenquimal, como osso, cartilagem, gordura e músculo. Essa diferenciação está diretamente relacionada aos sinais intrínsecos e extrínsecos que irão definir o fenótipo celular (25;32).

As células mesenquimais indiferenciadas têm a capacidade de promover a renovação tecidual, contribuindo, também, para a reposição dos osteoblastos na renovação óssea e na cicatrização das fraturas após trauma ou doença. Sendo

assim, a possibilidade de manipulação e formação de um novo tecido ósseo só é possível graças à presença de células-tronco que ficam armazenadas e dispersas em repouso, em diversos tecidos, como o esquelético, o muscular, o subcutâneo e o adiposo, até que, por algum estímulo, passam a se diferenciar em uma determinada linhagem celular, recapitulando o desenvolvimento osteogênico realizado durante a fase embrionária, mesmo em adultos com idades distintas (32;61-64).

O aspecto morfológico das células-tronco adultas, logo após serem colocadas em culturas foi semelhante ao de células com crescimento em suspensão. No entanto, após o primeiro dia, essas culturas passaram a apresentar populações que cresciam aderidas. Essa propriedade de adesão é característica das células da linhagem mesenquimal, enquanto que a população celular da linhagem hematopoiética tem como característica o crescimento em suspensão (63;65).

O crescimento e a manutenção do tecido ósseo são constituídos por um processo complexo, influenciado por hormônios sistêmicos e fatores de crescimento. O tecido ósseo contém vários fatores de crescimento, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), as quais são produzidas por osteoblastos onde, por meio de uma cascata de eventos, iniciam a proliferação de células-tronco mesenquimais indiferenciadas e finalizam com a formação óssea (47;66-68).

A BMP-4 tem a capacidade de induzir células primitivas a formar osso *in vitro* e *in vivo*. Além do mais, essa proteína atua principalmente nos primeiros estágios da diferenciação osteogênica. Portanto, essa proteína foi selecionada para o presente estudo por aumentar as chances de análise das etapas iniciais da osteogênese sobre células osteoprogenitoras menos diferenciadas (38;47;49;50).

O uso da BMP-4 como agente indutor segue também uma linha de investigação do nosso grupo de pesquisa com culturas, *in vitro*, de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, realizados por Loro (2002) (20), Silva Junior (2002) (69), Silva (2004) (70) e Paris (2004) (71). O diferencial do presente trabalho é a fonte de células-tronco adultas utilizadas as quais tiveram origem no tecido adiposo.

A expressão das proteínas, ALP, SPP1 e BGLAP em culturas de células-tronco de tecido adiposo, induzidas ou não com BMP-4, foi avaliada com o uso da técnica de RT-PCR. Ocorreram expressões de fosfatase alcalina e de osteopontina nos controles que não foram induzidos com BMP-4 nas culturas derivadas dos dois pacientes. Nas culturas de células de tecido adiposo derivadas do paciente 1, essas

expressões ocorreram no 14^o dia e nas culturas de células derivadas do paciente 2 a expressão ocorreu no 14^o dia para a osteopontina e no 21^o dia para a fosfatase alcalina. Este fato é justificável, pois esses dois genes, ALP e SPP1, não são marcadores específicos da osteogênese como o que ocorre com o gene BGLAP, o qual é restrito à linhagem osteogênica (51). Ainda, em um estudo desenvolvido anteriormente por nosso grupo, a osteopontina estava presente desde os primeiros dias de cultura, embora essas células tenham sido derivadas de medula óssea, independentemente da presença, ou não, de BMP-4 (20). No presente estudo os dados obtidos com relação à expressão da BGLAP nas culturas não induzidas estão de acordo, pois não foi detectada a expressão desse gene e a presença desta proteína somente é esperada em células osteogênicas.

A expressão da fosfatase alcalina tem uma regulação elevada em tecidos osteogênicos, mas sua expressão tem sido também observado em outros tipos celulares e tecidos, como em cartilagem, rim e fígado (72). Portanto, sua detecção deve ser feita em conjunto com um marcador específico para osteogênese, nessa técnica foi a osteocalcina.

A atividade da fosfatase alcalina em células da linhagem osteoblásticas está aumentada durante a diferenciação de pré-osteoblasto em osteoblasto, em um momento próximo ao final da fase de proliferação e durante o período de depósito de matriz extracelular e maturação (17;41). Por essa razão, a expressão dessa proteína é freqüentemente usada como um marcador de osteoblasto (41).

A osteopontina é expressa nas células de vários tecidos incluindo osso, dentina, cartilagem hipertrófica, rim, cérebro, tecido vascular e outros. Em osso, a osteopontina é produzida por células osteoblásticas em diversos estágios, e tem sido sugerido pela literatura que sua expressão ocorre em dois picos (73). Logo, essa proteína, em células-tronco da medula óssea, é detectável com níveis de expressão intermediários nos primeiros estágios de diferenciação durante a proliferação de precursores celulares como os pré-osteoblastos e em níveis elevados em osteoblastos (61;64) .

Com relação às culturas de células induzidas com BMP-4, detectou-se a expressão da fosfatase alcalina e osteocalcina nas células derivadas do paciente 1 no 14^o dia e sem expressão no 21^o dia. Já, nessas mesmas culturas, a osteopontina estava presente no 7^o e 21^o dia. Por outro lado, nas células derivadas do paciente 2 cultivadas em meio contendo BMP-4, não foi detectada a presença de fosfatase

alcalina, no entanto, as proteínas osteopontina e osteocalcina estavam presentes no 14^o e 21^o dias de cultura após indução. Assim, houve uma variação na expressão das proteínas fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina e no período dessa expressão em células tronco derivadas de tecido adiposo dos dois pacientes incluídos neste estudo. Estas observações só poderão ser confirmadas com estudos futuros, pois não há dados na literatura a respeito da expressão dessas proteínas em células derivadas de tecido adiposo cultivadas em meio contendo BMP-4. Por outro lado, dados relativos a culturas de células derivadas de medula óssea em meio contendo BMP-4 são abundantes. Por exemplo, a osteocalcina, em culturas de células-tronco derivadas da medula óssea é a última a ser expressa em osteoblastos maduros sendo indetectável em pré-osteoblastos, mas abundantemente expressa em osteoblastos maduros (74;75).

O meio DAG (dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato), atualmente, é considerado por vários autores como o osteoindutor mais eficiente (5;7;9;11;51;76). Sendo assim, o processo de diferenciação celular é controlado por uma cascata de eventos moleculares envolvidos na programação genética e regulação gênica através da ação de uma variedade de hormônios, citocinas e fatores de crescimento (77). O glicocorticoide influencia na proliferação e diferenciação das células da linhagem osteogênica causando alteração na concentração de fatores de crescimentos e hormônios interferindo em suas vias de sinalização (52). O ácido ascórbico é necessário para a síntese da matriz de colágeno e do seu depósito (41;78). O β -glicerolfosfato promove a mineralização *in vitro* pelo mecanismo de modulação da atividade metabólica de células ósseas e serve como fonte local de íons e fosfatos inorgânicos (79).

A expressão da proteína osteocalcina e osteopontina foi detectada pela técnica da PCR em tempo real em células derivadas de tecido adiposo do paciente 3, cultivadas em meio DAG. No entanto, a presença da osteocalcina no sétimo dia de cultura não era esperada, pelo menos em culturas de células derivadas de medula óssea. Esta discordância também tem sido observada na literatura onde os autores não obtiveram consenso com relação ao período preciso no qual esta proteína é expressa em culturas de células derivadas de tecido adiposo (17;51;80). Por outro lado, a expressão da osteopontina foi detectada em altos níveis no 14^o dia após a indução. Não estando de acordo com a literatura encontrada, que utiliza a mesma condição de indução e o mesmo tipo célula (51).

Ainda, a diferenciação osteogênica das células derivadas do tecido adiposo deste paciente 3 foi confirmada em culturas em meio DAG pela marcação positiva para fosfatase alcalina e von Kossa pela técnica de citoquímica. Estas duas alternativas de confirmação citoquímica são amplamente empregadas na literatura como requisitos para certificação da osteogênese completa, pois confirmam a presença de fosfatase alcalina e a deposição de cálcio na matriz extracelular (5;7;9;11;76;81). Essa última marcação só é observada em osteoblastos maduros que secretam colágeno tipo I, rico em matriz extracelular de cálcio, a qual se torna calcificada durante os estágios mais tardios de diferenciação (82).

PERSPECTIVAS

Esta pesquisa foi realizada apenas com amostras de pacientes do gênero feminino por representarem a grande maioria da população submetida a esse procedimento (lipoaspiração). Um estudo com células derivadas de pacientes do gênero masculino é necessário para confirmar esses resultados pois, já existe na literatura trabalhos que afirmam a influência dos hormônios estrógenos na expressão da fosfatase alcalina e da osteocalcina (5;76).

Além das diferenças entre gênero, podemos estar sujeitos às diferenças inerentes entre os indivíduos (genética). Além disso, o perfil de expressão gênica dos osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais de um tipo de tecido, como por exemplo, da medula óssea, pode não ser necessariamente o mesmo para osteoblastos derivados de culturas de células de tecido adiposo.

7 CONCLUSÕES

O estudo *in vitro* da diferenciação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo cultivadas, ou não, em meio osteogênico mostrou que:

1. As células aderem e proliferam em cultura;
2. As células sofrem osteoindução quando cultivadas na presença de meio contendo BMP-4 ou DAG;
3. As células expressam proteínas marcadoras da linhagem osteogênica como a fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina;
4. As células apresentam deposição de matriz mineralizada pelo menos quando cultivadas em meio contendo DAG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Daley G Q, Goodell M A, Snyder E Y. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 398-418. 2003.
- (2) Fodor W L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*. 1[102], 1-6. 2003.
- (3) Horwitz E M. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res*. 34[6], 600-606. 2003.
- (4) Zago M A, Covas D T. *Células-tronco, a nova fronteira da medicina*. 2006. São Paulo, Atheneu.
- (5) Aksu A E, Rubin J P, Dudas J R, Marra K g. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 60[3], 306-322. 2008.
- (6) Fuchs E, Segre J A. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 100[1], 143-155. 2000.
- (7) Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 70[4], 300-306. 2003.
- (8) Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. 40[Pt 1], 17-24. 2004.
- (9) Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J W, Katz A J et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7[2], 211-228. 2001.

(10) Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 36[4], 568-584. 2004.

(11) Im G I, Shin Y W, Lee K B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 13[10], 845-853. 2005.

(12) Muschler G F, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H et al. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res.* [407], 102-118. 2003.

(13) Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov S M, Mukhachev V, Lavroukov A et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 344[5], 385-386. 2001.

(14) Ponticiello M S, Schinagl R M, Kadiyala S, Barry F P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res.* 52[2], 246-255. 2000.

(15) Solchaga L A, Gao J, Dennis J E, Awadallah A, Lundberg M, Caplan A I. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.* 8[2], 333-347. 2002.

(16) Young R G, Butler D L, Weber W, Caplan A I, Gordon S L, Fink D J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 16[4], 406-413. 1998.

(17) Beck G R Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97[15], 8352-8357. 2000.

(18) Cheng H, Jiang W, Phillips F M, Haydon R C, Peng Y, Zhou L et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 85-A[8], 1544-1552. 2003.

(19) Otto W R, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 37[1], 97-110. 2008.

(20) Loro R. Estudo *in vitro* da osteoindução de células da medula óssea humana. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2002.

(21) Bang O Y, Lee J S, Lee P H, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 57[6], 874-882. 2005.

(22) Barry F P, Boynton R E, Haynesworth S, Murphy J M, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 265[1], 134-139. 1999.

(23) Wagner W, Ho A D. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 3[4], 239-248. 2007.

(24) Draper J S, Fox V. Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Arch Med Res.* 34[6], 558-564. 2003.

(25) Caplan A I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9[5], 641-650. 1991.

(26) Chen Y, Shao J Z, Xiang L X, Dong X J, Zhang G R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 40[5], 815-820. 2008.

(27) Fraser J K, Wulur I, Afonso Z, Hedrick M H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24[4], 150-154. 2006.

(28) Fagot-Largeault A. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. *Estud.av.* 18[51], 227-245. 2004.

(29) Beltrami A P, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 114[6], 763-776. 2003.

(30) dos Santos R R, Soares M B, de Carvalho A C. Bone marrow cells transplant in the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37[6], 490-495. 2004.

(31) Krause D S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 9[11], 754-758. 2002.

(32) Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284[5411], 143-147. 1999.

(33) Quaini F, Urbanek K, Beltrami A P, Finato N, Beltrami C A, Nadal-Ginard B et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 346[1], 5-15. 2002.

(34) Karsenty G, Wagner E F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2[4], 389-406. 2002.

(35) Nakashima K, Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*. 19[8], 458-466. 2003.

(36) Ramoshebi L N, Matsaba T N, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U. Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med*. 4[20], 1-11. 2002.

(37) Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology*. 146[3], 1012-1017. 2005.

(38) Long M W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis*. 27[3], 677-690. 2001.

(39) Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 8[3], 147-159. 2002.

(40) Kierszbaum A L. *Histologia e Biologia Celular; Uma introdução à patologia*. 2004. Rio de Janeiro, Elsevier.

(41) Davies J E. *Bone Engineering*. 1999. Canada.

(42) Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 21[7], 667-681. 2000.

(43) Franz-Odenaalm T A, Hall B K, Witten P E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 235[1], 176-190. 2006.

(44) Einhom T A. Enhancement of fracture healing. *Instr Course Lect.* 45, 401-416. 1996.

(45) Celeste A J, Iannazzi J A, Taylor R C, Hewich R M, Rosen V, Wang E A et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87[24], 9843-9847. 1990.

(46) Raval P, Hsu H H, Anderson H C. Osteoinductive ability of confluent Saos-2 cell correlates with enhanced expression of bone morphogenetic proteins. *J Orthop Res.* 14[4], 605-610. 1996.

(47) Zhou H, Hammonds R G, Findlay D M, Martin T J, Ng K W. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J Cell Physiol.* 155[1], 112-119. 1993.

(48) Ten Dijke, Yamashita H, Sampath T K, Reddi A H, Estevez M, Riddle D L et al. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem.* 269[25], 16985-16988. 1994.

(49) Reddi A H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8[1], 11-20. 1997.

(50) Li G, Berven S, Simpson H, Triffitt J T. Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 69[4], 420-425. 1998.

(51) Zuk P A, Zhu Min, Ashjian P, De Urigarte D A, Huang J I, Mizuno H et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13[12], 4279-4295. 2002.

(52) Cooper M S, Hewison M, Stewart P M. Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol*. 163[2], 159-164. 2008.

(53) Tuan R S, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 5[1], 32-45. 2002.

(54) Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler W T, Sorensen E S et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int*. 77[1], 45-54. 2005.

(55) Price P A, Otsuka A A, Poser J W, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73[5], 1447-1451. 1976.

(56) Price P A, Poser J W, Raman N. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73[10], 3374-3375. 1976.

(57) Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 25[4], 402-408. 2001.

(58) Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29[9], 2002-2007. 2001.

(59) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8[6], 315-317. 2006.

(60) de Girolamo L, Sartori M F, Albisetti W, Brini A T. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med*. 1[2], 154-157. 2007.

(61) Aubin J E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol*. 76[6], 899-910. 1998.

(62) Aubin J E. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl*. 30-31[73], 82. 1998.

(63) Aubin J E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 72[3], 396-410. 1999.

(64) Turgerman G, Pittman D D, Müller R, Kurkalli B G, Zhou S, Pelled A et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*. 3[3], 240-251. 2001.

(65) Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 18[9], 959-963. 2008.

(66) Chen D, Harris M A, Rossini G, Dunstan C R, Dallas S L, Feng J Q et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone

matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 60[3], 283-290. 1997.

(67) Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 22[6], 410-416. 1998.

(68) Wozney J M, Rosen V, Byne M, Celeste A J, Moutsatsos I, Wang E A. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl.* 13, 149-156. 1990.

(69) Silva Jr A. Análise *in vitro* da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de titânio e submetidas à irradiação com laser não-cirúrgico. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.

(70) Silva T. Efeito da rugosidade de superfícies de discos de titânio sobre proliferação e diferenciação de células de medula óssea humanas. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2004.

(71) Paris M A. Avaliação da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de hidroxiapatita e titânio. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2004.

(72) Weiss M J, Ray K, Henthorn P S, Lamb B, Kadesch T, Harrisn H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem.* 263[24], 12002-12010. 1988.

(73) Sodek J, Ganss B, McKee M D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 11[3], 279-303. 2000.

(74) Aubin J E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 76[6], 899-910. 1998.

(75) Aubin J E. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31, 73-82. 1998.

(76) Hong L, Caplan A, Peptam I, Daw J, George A, Evans C A. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 13[6], 1197-1203. 2007.

(77) Ducky P, Karsenty G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 10[5], 614-619. 1998.

(78) Xiao G, Cui Y, Ducky P, Karsenty G, Franceschi R T. Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol Endocrinol.* 11[8], 1103-1113. 1997.

(79) Chung C H, Golub E E, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro I M. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.* 51[4], 305-311. 1992.

(80) Zhou Y S, Liu Y S, Tan J G. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J (Engl).* 119[15], 1278-1286. 2006.

(81) Egusa H, Lida K, Kobayashi T, Lin T Y, Zhu M, Zuk P A et al. Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 13[10], 2589-2600. 2007.

(82) Scott D M, Kent G N, Cohn D V. Collagen synthesis in cultured osteoblast-like cells. *Arch Biochem Biophys.* 201[2], 384-391. 1980.