

Influência do envelhecimento no rendimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos

Influence of aging on the in vitro yield of mice bone marrow mesenchymal stem cells

Maria de Lourdes Freitas¹, Daniele Maria Lopes Pinheiro¹, Fernanda Ginani¹,
Mardem Portela e Vasconcelos Barreto¹, Carlos Augusto Galvão Barboza¹

¹Curso de Biomedicina do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.

Resumo

Objetivo – Avaliar a influência do processo de envelhecimento sobre a capacidade de adesão e proliferação das células mesenquimais da medula óssea de camundongos, comparando-se dois grupos de animais: jovens (30 dias de idade) e senis (18 meses de idade). **Métodos** – Extratos de medula óssea foram coletados do canal medular de tibia e fêmur de camundongos jovens (n=5) e senis (n=5) e as células mesenquimais foram cultivadas em meio de cultura alfa-MEM nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. **Resultados** – Observou-se uma curva crescente de proliferação celular nos animais jovens, enquanto nos animais senis houve uma grande redução no número de células no intervalo de 72 horas. **Conclusão** – A idade do animal é um fator importante no rendimento *in vitro* de células mesenquimais da medula óssea nos períodos iniciais do cultivo, o que pode influenciar no resultado dos experimentos com este tipo celular.

Descritores: Envelhecimento; Medula óssea; Células-tronco mesenquimais

Abstract

Objective – To evaluate the influence of aging on the adhesion and proliferation of mesenchymal cells from mice bone marrow, comparing two groups: young (30 days old) and senile (18 months old) animals. **Methods** – Extracts of bone marrow were collected from the marrow cavity of the tibia and femur of young (n=5) and senile (n=5) mice and the mesenchymal cells were cultured in MEM for intervals of 24, 48 and 72 hours. **Results** – It was found an increased curve of cell proliferation in young animals while in senile animals there was a large reduction in cell number in the 72 hours period. **Conclusion** – The animal's age is an important factor in the *in vitro* yield of from bone marrow mesenchymal cells in the early periods of culture, which may influence the results of experiments with this cell population.

Descriptors: Aging; Bone marrow; Mesenchymal stem cells

Introdução

O uso de células-tronco tem sido bastante enfatizado na literatura, devido ao seu potencial reparador. Considera-se como célula-tronco um tipo especial de célula que apresenta capacidade de se renovar e originar diferentes tipos celulares especializados, não possuindo nenhuma função específica até que receba um sinal, direcionando-a para a diferenciação em uma célula especializada¹. Dentre as células-tronco, as mesenquimais (CTMs) são alvo de muito interesse em pesquisas por não apresentarem barreiras éticas e pela facilidade de obtenção², sendo a medula óssea sua maior fonte³.

Apesar de constituírem uma pequena população celular na medula óssea⁴, as CTMs podem ser expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares⁵⁻⁶. O interesse neste tipo celular cresceu nos últimos anos em virtude de seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados, como demonstrados em estudos pré-clínicos e clínicos⁷.

Ao longo dos anos, diversos órgãos e tecidos do animal perdem progressivamente sua capacidade de funcionamento, seja por causa de alguma doença ou pelo processo natural de envelhecimento. Este processo ocorre em todos os níveis celulares do organismo, com particularidades para cada tecido, e é resultado de danos às moléculas, células e tecidos, que gradativamente perdem a capacidade de se adaptar ou de reparar uma lesão⁸.

Novos desafios surgem na distinção entre o envelhecimento *in vivo* e *in vitro*, e há controvérsias se o cultivo prolongado pode ou não simular o envelhecimento verdadeiro⁹. Este tema tem preocupado diversos pesquisadores, especialmente aqueles que visam à reparação tecidual através da cultura celular, uma vez que as consequências do envelhecimento tecidual podem comprometer os resultados clínicos destes experimentos. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do envelhecimento do animal no rendimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais da medula óssea, comparando-se a adesão e proliferação de células obtidas de camundongos jovens e senis.

Métodos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob o protocolo nº 008/2009. Para a extração da medula óssea foi utilizado um grupo de dez camundongos albinos machos Swiss, sendo cinco jovens (30 dias de idade) e cinco senis (18 meses de idade), obtidos do Laboratório de Cronobiologia da UFRN. Os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg peso, via intraperitoneal) e dissecados para remoção dos fêmures e tíbias.

A extração de medula foi feita de acordo com o procedimento descrito por Maniopoulos *et al.*¹⁰ (1988). Em uma câmara de fluxo laminar e sob condições assépticas,

foram feitos cortes nas epífises dos ossos e a medula foi extraída através da lavagem do canal medular com meio a-MEM contendo 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B (Cultilab, Brasil) e suplementado com 15% de soro fetal bovino FBS (Gibco, USA). Os extratos de medula foram submetidos ao cultivo em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂, com troca de meio a cada três dias, até atingirem 70 a 100% de confluência celular nas placas.

Para comprovação do potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, alíquotas de células de cada animal foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênica e adipogênica (*StemPro® Differentiation Kits, Invitrogen, USA*) por até 21 dias. A avaliação por microscopia de luz revelou a formação de nódulos mineralizados corados por von Kossa e células com morfologia semelhantes a adipócitos coradas por Oil Red.

No terceiro subcultivo, alíquotas contendo 1 x 10⁴ células de cada animal foram cultivadas em placas de 6 poços (TTP, USA), por três intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas), para avaliar a adesão e proliferação das células mesenquimais da medula óssea, estabelecendo-se uma curva de crescimento celular nos dois grupos. Após os intervalos experimentais, as células foram submetidas a contagem em câmara de Neubauer por um mesmo avaliador.

Os dados obtidos no ensaio de proliferação celular foram submetidos à análise não paramétrica. Cada dado das contagens celulares correspondeu à média ± dp (desvio padrão da média) de trinta amostras por intervalo em cada grupo. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo método Kruskal-Wallis para dados não relacionados entre si e pelo teste de Mann Whitney para dados do mesmo grupo; em ambos os testes foram considerados um nível de significância de 5%.

Resultados

As médias do crescimento celular nas diferentes idades dos camundongos e tempos experimentais são demonstradas no Gráfico 1. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,0001$).

Realizada a análise do crescimento celular dos diferentes estágios de maturidade dos animais em um mesmo intervalo de tempo, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos jovens e senis, nos intervalos de 24 horas e 72 horas (Gráfico 1).

A análise da curva de crescimento celular mostra tendências diferentes das células da medula óssea de camundongos em diferentes idades no decorrer do tempo experimental. As células dos camundongos jovens apresentaram uma tendência de proliferação a partir de 48 horas; já em relação às células dos camundongos senis observou-se uma redução no número de células após o intervalo de 48 horas (Gráfico 2).

A análise estatística das médias de crescimento celular em animais jovens revelou diferenças significativas entre os intervalos de tempo de 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Já nos animais senis ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os intervalos de tempo 24 e 72 horas e 48 e 72 horas (Gráfico 2).

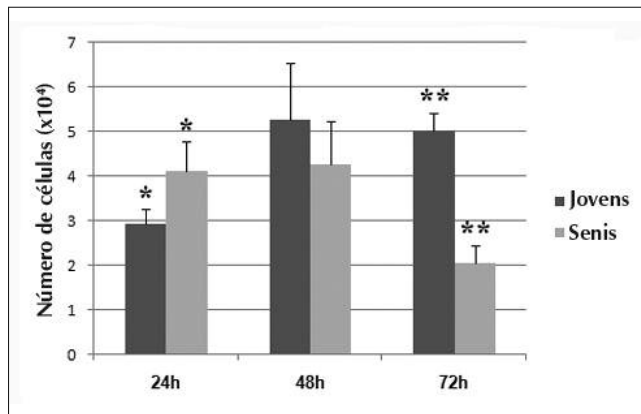


Gráfico 1. Médias e desvios padrões do crescimento celular nos dois grupos experimentais, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. * $p = 0,009$; ** $p = 0,005$

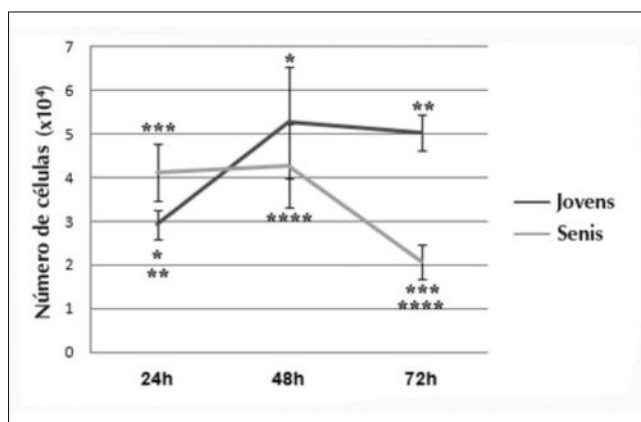


Gráfico 2. Curva de crescimento celular nos dois grupos estudados. * $p = 0,0047$; ** $p = 0,0047$; *** $p = 0,0048$; **** $p = 0,0086$

Discussão

O envelhecimento pode ser defendido como um processo deteriorativo, progressivo e irreversível, característico da maioria dos sistemas e que, por ser progressivo, há uma grande probabilidade de morte, seja de uma célula ou até mesmo do animal¹¹. É um processo muito complexo, influenciado pela estrutura genética do animal e por fatores ambientais¹².

Os resultados do presente trabalho mostraram uma diferença na curva de crescimento das células mesenquimais obtidas da medula óssea de animais senis, quando comparadas àquelas obtidas de animais jovens. Neste último caso, as células aumentaram em quantidade a partir de 48 horas; já no grupo senil, houve uma drástica redução no número de células no momento mais tardio do experimento (72 horas), o que provavelmente é uma consequência de modificações em três fatores importantes e interdependentes no microambiente celular: a ação da telomerase, o processo de senescência celular e a matriz extracelular. Xin *et al.*¹³ (2010) também demonstraram que as propriedades biológicas das células envelhecidas em termos de proliferação, diferenciação, liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e habilidades migratórias são significativamente comprometidas quando comparadas às propriedades de células jovens.

Atualmente é considerado que a chave do envelhecimento está no processo da divisão celular e que o relógio biológico que controla a vida de cada célula seria os telômeros, os quais formam regiões terminais de todos os cromossomos¹⁴. A função do telômero no ciclo celular e nos processos de senescência e controle da expressão gênica a nível transcricional ainda não está completamente elucidada¹⁵. Através de mecanismos bioquímicos próprios à replicação do DNA, cerca de 50 a 200 pares de bases de DNA teloméricos deixam de ser replicadas durante a divisão celular. A telomerase, enzima responsável pela síntese de novo DNA telomérico, não se expressa na maioria das células humanas e, como consequência, os telômeros se encurtam em cada ciclo celular já que não há o restabelecimento do tamanho prévio dos cromossomos¹⁶⁻¹⁸. Este fato reforça os achados deste trabalho onde o índice de proliferação celular foi menor nas células obtidas de animais senis, representando a ausência da ação da telomerase.

A senescência celular é caracterizada pela perda da capacidade proliferativa das células. Nos anos 90, este processo ficou conhecido por senescência replicativa, sendo governado por um encurtamento do telômero⁹. Estudo com fibroblastos de pulmão humano constatou apenas um número limitado de duplicação celular antes do fracasso da cultura, o que demonstra a capacidade proliferativa limitada *in vitro* de células diplóide¹⁹. Estas limitações parecem estar relacionadas à idade dos fibroblastos vivos; os fibroblastos de doadores mais velhos obtiveram menor tempo de cultivo, o que resulta em estado de senescência²⁰, o que também pode justificar os resultados encontrados no presente estudo.

Um ambiente de sinalização *in vivo* é rigorosamente controlado por um nicho complexo que determina as propriedades e o comportamento das células presentes neste ambiente. A função principal deste nicho é a manutenção da renovação celular, a partir da exposição das células-tronco do nicho a sinais extrínsecos originários da interação com a matriz extracelular – MEC²¹. As propriedades desta matriz podem ser influenciadas por meio de secreção de fatores de crescimento, citocinas e metaloproteínases da matriz que afetam a atividade biossintética das células do estroma²². Estes resultados mostraram que as células dos animais jovens apresentaram um potencial de proliferação que pode ser atribuído a uma maior presença de fatores de crescimento e citocinas secretadas pelas células. Já nas células dos animais senis, a perda da capacidade proliferativa pode estar relacionada à diminuição da secreção desses fatores.

O trabalho realizado por Chen *et al.*²³ (2007) demonstrou que as células-tronco mesenquimais de roedores não requerem apenas marcadores de superfície específicos, mas também um sistema de cultura que permite a sua manutenção *in vitro*. Esses achados fornecem um forte apoio à hipótese de que a MEC da medula faz parte do nicho que dá suporte às unidades formadoras de colônias na medula óssea. Além disso, a MEC regula o equilíbrio da replicação em resposta a sinais adequados, o que reforça os resultados desta pesquisa.

A perda de autorenovação e a aquisição de defeitos na diferenciação de células-tronco são, parcialmente, as responsáveis pelo típico fenótipo do processo de enve-

lhhecimento. O mecanismo molecular que contribui para o envelhecimento de células-tronco está também envolvido na eliminação através da senescência ou da apoptose de células com danos genéticos que poderiam representar um risco para a integridade do organismo²⁴.

Conclusão

A idade do animal influenciou no rendimento *in vitro* de células mesenquimais da medula óssea, nas primeiras 72 horas de cultivo. Células obtidas de animais senis apresentaram um declínio na adesão e proliferação celular, fator este que pode influenciar no resultado de experimentos com este tipo celular. Estudos posteriores avaliando a relação entre a capacidade proliferativa das células-tronco e o envelhecimento poderão contribuir para a compreensão do mecanismo envolvido.

Referências

1. Souza VF, Lima LMC, Reis SRA, Ramalho LMP, Santos JN. Células-tronco: uma breve revisão. *Rev Ciênc Med Biol.* 2003;2(2):251-6.
2. Kirschstein R. Stem cells: scientific progress and future research directions. Department of Health and Human Services; 2001. [acesso 21 out 2010] Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>
3. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41-9.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
5. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(2):135-42.
6. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34(6):565-71.
7. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-84.
8. Pardo Andreu G, Hernández Casaña P, Delgado Hernández R. La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Rev Cuba Med [online].* 2005;44:(1-2).
9. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006;5(1):91-116.
10. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988;254(2):317-30.
11. Sames K, Sethe S, Stolzing A. Extending the lifespan: biotechnical, gerontological and social problems. Hamburg, GE: Lit Verlag Münster; 2005.
12. Alvarez L, Javier F. Biología celular y molecular del envejecimiento neural: estado actual y perspectivas. *Salud Ment.* 1999; 22(5):6-16.
13. Xin Y, Wang YM, Zhang H, Li J, Wang W, Wei YJ *et al.* Aging adversely impacts biological properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: implications for tissue engineering heart valve construction. *Artif Organs.* 2010;34(3):215-22.
14. Teixeira INDO, Guariento ME. Biología do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2010; 15(6):2845-57.

15. Blackburn E. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000; 408 (6808):53-6.
16. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*. 1997;17(2):231-5.
17. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB *et al.* Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279(5349):349-52.
18. Kim SH, Kaminker P, Campisi J. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene*. 2002;21(4):503-11.
19. Wright WE, Shay JW. Mechanism of escaping senescence in human diploid cells. *In: Hobrook NJ, Martin GR, Lockshin RA, editors. Cellular aging and cell death*. New York: John Willey & Sons, 1996 (Modern Cell Biology Series).
20. Botnick LE, Hannon EC, Hellman S. Limited proliferation of stem cells surviving alkylating agents. *Nature*. 1976;262(5563):68-70.
21. Kobel S, Lutolf M. High-throughput methods to define complex stem cell niches. *Biotechniques*. 2010;48(4):9-22.
22. Schuppan D, Somasundaram R, Dieterich W, Ehnis T, Bauer M. The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation. *Ann NY Acad Sci*. 1994;733:87-102.
23. Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2007;22(12): 1943-56,
24. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cell. *Exp Cell Res*. 2008;314(9):1937-44.

Endereço para correspondência:

Carlos Augusto Galvão Barboza
Curso de Biomedicina
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Av. Salgado Filho, 3000 – Campus Universitário
Natal-RN, CEP 59072-970
Brasil

E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br

Recebido em 11 de novembro de 2011
Aceito em 13 de fevereiro de 2012