

ESTUDO DOS EFEITOS DOS SAIS DA SÉRIE DE HOFMEISTER NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Artur Alves Rodrigues da Silva¹; Claudio Gabriel Rodrigues²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: arturalves1994@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Biofísica e Radiologia – CCB – UFPE. E-mail: cgrufpe@gmail.com.

Sumário: O uso de células-tronco na pesquisa médica pode levar ao surgimento de uma nova forma de tratamento para tecidos lesados principalmente àqueles com baixa ou nenhuma capacidade regenerativa, tais como tecido ósseo, adiposo, nervoso e cardíaco. Isso é possível devido à capacidade destas células se diferenciarem em vários tecidos e também devido ao seu grande potencial proliferativo. Neste trabalho investigamos como os sais de Hofmeister influenciam a proliferação e diferenciação das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (hWCTMs). Nosso objetivo é descobrir substâncias que possam ser usadas no controle da diferenciação e expansão *in vitro* destas células. As hWCTMs foram submetidas a dois sais: cloreto de bário e brometo de potássio. Por meio de ensaios de citotoxicidade e de diferenciação os processos de proliferação e diferenciação foram avaliados. Desta forma, esta pesquisa visa contribuir com subsídio de informações para o favorecimento da aplicação de células-tronco na terapia celular e engenharia tecidual.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; cordão umbilical, sais de Hofmeister, proliferação celular.

INTRODUÇÃO

As células-tronco são indiferenciadas, se autorenovam e apresentam excelente capacidade proliferativa. Quando estimuladas adequadamente, as células-tronco podem se diferenciar em vários tipos celulares, como por exemplo células ósseas, cartilaginosa e adiposa, entre outras (MALGIERI et al, 2010). Devido a esta refinada plasticidade, as células-tronco têm sido alvo de intensas pesquisas e muitas questões com relação aos mecanismos moleculares de proliferação, indução e diferenciação precisam ser esclarecidos até o momento em que as mesmas possam ser utilizadas sem efeitos contraditórios ao organismo (CIAVARELLA et al., 2011). A proliferação celular é uma propriedade fundamental no crescimento tecidual tanto quanto na reprodução celular. Uma célula se reproduz por uma sequência ordenada de eventos que resultam na duplicação de seus componentes e consequentemente na sua divisão em duas células idênticas. Esse processo de duplicação do conteúdo celular e divisão para formar novas células representam o ciclo celular, e basicamente constitui o mecanismo pelo qual todos os organismos se reproduzem. Os processos moleculares que caracterizam os principais eventos do ciclo celular como replicação do DNA e mitose são fundamentalmente similares em todas as células. Dentre as células-tronco já descritas, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são as que apresentam grande plasticidade, caracterizando-se por ser uma população de células progenitoras multipotentes. São extremamente raras nos tecidos em que ocorrem, ganhando destaque as CTMs do cordão umbilical humano, isoladas da geleia de Wharton (hWCTMs) (TROYER & WEISS, 2008). Obviamente a descoberta de agentes físicos, químicos ou físico-químicos que possam influenciar no processo de diferenciação e proliferação das células será de grande valia, pois, possibilitará uma forma não somente de

expandir a população de células-tronco, bem como, direcioná-las à formação de tipos celulares específicos. Agentes como os sais da série de Hofmeister podem influenciar a agregação e o crescimento de células, especificamente bacterianas, porém, não há relatos na literatura sobre sua ação nas células-tronco mesenquimais, assim sendo pretendemos investigar como os sais de Hofmeister alteram a proliferação e diferenciação das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton, visando descobrir substâncias que possam ser usadas no controle da diferenciação e expansão *in vitro* destas células.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os cordões foram obtidos através de partos cesarianos com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pela parturiente. Iniciamos o processamento do cordão com uma lavagem com solução estéril contendo 7,5 mL de PBS/EDTA 3 mM e 492,5 mL PBS para a retirada das células sanguíneas. Em seguida o cordão foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 cm e a veia e as artérias foram retiradas e desprezadas. O isolamento celular foi por migração espontânea, resumidamente, a técnica consiste na remoção das artérias e veias cirurgicamente do cordão umbilical e descartadas; o tecido contendo a geleia de Wharton foi então cortado em pedaços de ~ 3 cm de comprimento. Os pedaços foram cultivados em garrafas plásticas de cultura, contendo meio Low DMEM (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), fator de crescimento (F12, Gibco) e antibióticos. Posteriormente, as garrafas foram colocadas na estufa a 37° C, 80% umidade e 5% CO₂. As células da terceira passagem foram incubadas com anticorpos monoclonais fluorescentes CD90 (eBioscience), CD44 e CD29 (SouthernBiotech) associados a FITC, e CD45, CD34 e CD31 associados a PE, todos diluídos 1/2000, mantidos a 4 °C, 60 min. A análise da proliferação das células-tronco mesenquimais na presença e ausência dos sais de Hofmeister foi realizada por contagem manual através da câmara de Neubauer. As células do grupo controle foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (5000 células/poço) em volume de 200 µl de meio Low DMEM, suplementado com soro fetal bovino, fator de crescimento e antibióticos (penicilina e estreptomicina). No grupo teste, as células foram submetidas aos sais (KBr e BaCl₂). A placa foi acomodada em incubadora a 37°C em 5% de CO₂ e 80% de umidade. A contagem das células ocorreu durante 3 dias consecutivos, e os dados foram plotados no Origin (Origin LAb. V8.1) para confecção da curva de proliferação celular. Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizada a técnica do MTT. Nesta, a análise da viabilidade celular se baseia na atividade mitocondrial das células através da redução do MTT. As células foram semeadas em placas de 96 poços (5000 células/poço). No grupo teste, as células foram submetidas aos sais (KBr e BaCl) da série de Hofmeister. A leitura foi feita por espectrofotometria, 72 horas após plaqueamento e incubação. A diferenciação das hWCTMs em osteoblastos foi realizada após a terceira passagem, induzida por meio de reagentes específicos adquiridos através dos kits comercializados, de acordo com as instruções do fabricante (Stem Cell Technology inc., USA). As células foram divididas em três grupos diferentes: sem indução química e ausência do sal, apenas indução química e indução química na presença do sal. A efetividade da diferenciação foi observado por meio da aplicação do corante Alizarin Red.

RESULTADOS

Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstraram que as células derivadas e isoladas do cordão possuem características imunofenotípicas específicas de células-tronco mesenquimal (CTM) (**Figura 1**). Avaliamos, como podemos visualizar na **figura 2.**, a influência do sal de Hofmeister, cloreto de bário, na proliferação celular durante 72 horas de cultura nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 mg/L. Na **Figura 3** podemos visualizar os resultados referentes aos ensaios de citotoxicidade das células-tronco mesenquimais que

foram submetidas aos sais de Hofmeister (KBr e BaCl), utilizando a técnica do MTT. Na **figura 4** as células foram divididas em três grupos diferentes: sem indução química e ausência do sal, apenas indução química e indução química na presença do sal. A efetividade da diferenciação foi observado por meio da aplicação do corante Alizarina Red. Observamos histologicamente a diferenciação celular.

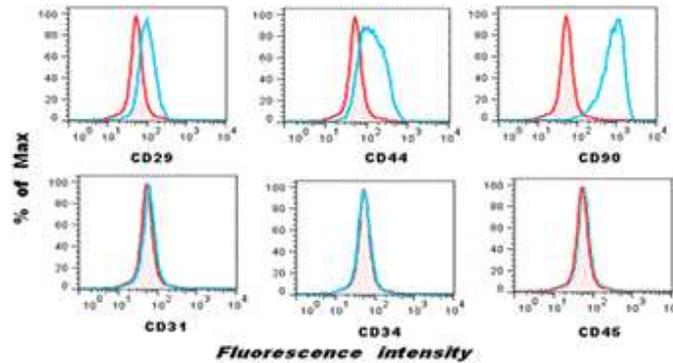


Figura 1. Expressão dos marcadores negativos, típicos de células progenitoras hematopoiéticas como CD14, CD34 e CD45 e positivas para os antígenos característicos de CTM: CD29, CD44 e CD90.

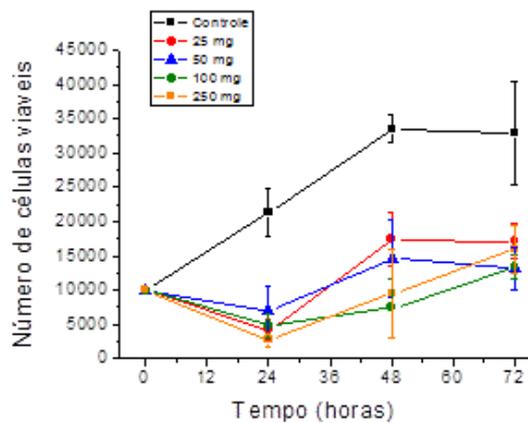


Figura 2. Perfil de proliferação das células-tronco na condição controle e também sob a influência do Cloreto de Bário, nas concentrações: 25; 50; 100 e 250 mg/L. (n = 3).

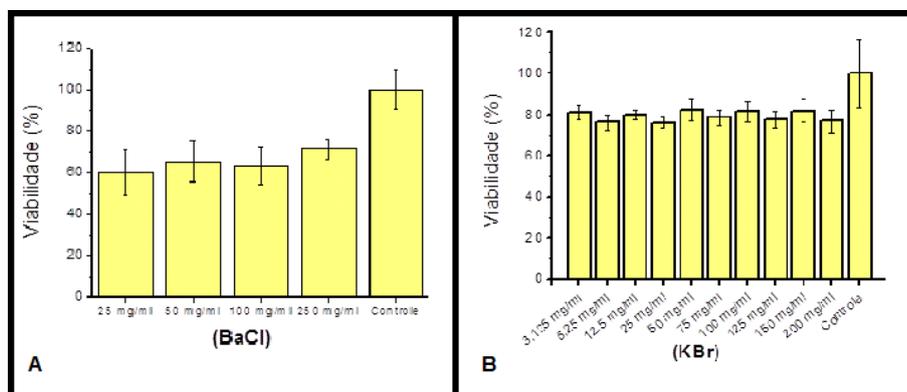


Figura 3. Ensaio de citotoxicidade realizado com o cloreto de bário (A) e com Brometo de Potássio (B), através da técnica do MTT. Na condição experimental, as células foram submetidas ao sal em diferentes concentrações: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100; 125; 150, e 200 mg/L. (n = 3)

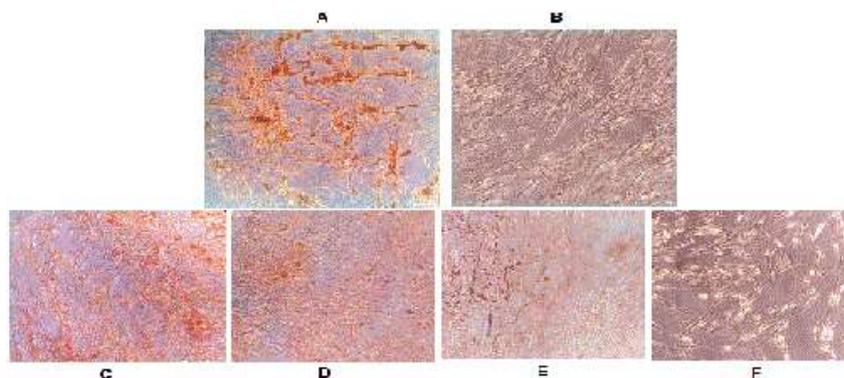


Figura 4. A – Meio de cultura e indução química; B – Somente meio de cultura; Meio de cultura e sais nas concentrações: C –25mg/L de BaCl₂; D – 50 mg/L de BaCl₂; E – 100 mg/L de BaCl₂ e F – 250 mg/L de BaCl₂.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstraram que as células derivadas e isoladas do cordão possuem características imunofenotípicas específicas de células-tronco mesenquimal (CTM). A expressão foi negativa para os marcadores típicos de células progenitoras hematopoiéticas como CD14, CD34 e CD45 e positivas para os antígenos característicos de CTM: CD29, CD44 e CD90, em acordo com outros estudos (MIRANDA-OLIVEIRA et al., 2009; MALAGUETA-VIEIRA et al., 2010; ALBERTIM et al., 2010). A ação dos sais de Hofmeister sobre as células-tronco mesenquimais mostrou eficiência somente com o íon Cloreto de Bário (BaCl₂). Ensaio de acompanhamento da proliferação celular com Neubauer e de citotoxicidade com o MTT demonstraram que o íon inibe o crescimento celular, não alterando a capacidade de diferenciação dessas células, fator este, importante para demonstrar que as células-tronco continuam viáveis após exposição aos sais de Hofmeister (LO NOSTRO et al., 2012). Acredita-se que a ação de bloqueio exercida pelo bário sobre os canais de potássio contribuiu para a inibição (SOBEY., 2001), contudo, os mecanismos moleculares ainda não foram bem estabelecidos. O segundo íon utilizado neste estudo foi o Brometo de Potássio (KBr), os resultados preliminares do MTT mostraram uma total neutralidade quando as células foram expostas a este sal, não alterando a proliferação celular (LO NOSTRO et al., 2012). Contudo maiores estudos são necessários, na tentativa de avaliar de forma mais concreta o efeito dos sais de Hofmeister sobre as células-tronco mesenquimais

CONCLUSÕES

Concluimos preliminarmente o cloreto de bário inibe a proliferação das CTMs, acredita-se que sua ação é baseada no bloqueio dos canais de potássio, enquanto que o Brometo de potássio não foi tóxico às células, bem como não influenciou de forma positiva a taxa de proliferação celular.

AGRADECIMENTOS

CNPq, Hospital De Àvila e a toda equipe do Laboratório de Biofísica de Membranas.

REFERÊNCIAS

- CIAVARELLA S, DOMINICI M, DAMMACCO F, SILVESTRIS F. Mesenchymal Stem Cells: A New Promise in Anticancer Therapy. *Stem cells and development* Volume 20, Number 1; 2011
- LO NOSTRO, P. & NINHAM, B.W. Hofmeister Phenomena: an update on ion specificity in biology. *Chemical Reviews*, v. 112, p. 2286-2322, 2012.
- SILVA M.B., et al. 2010. Ion Channels In Volume Regulation And Cell Cycle Progression Of Clonal Kidney Cells
- SOBEY CG. Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:28-38; 2001.