

Oncostatina M: Influência sobre a Proliferação de Células-Tronco Adiposo-Derivadas Humanas e Aplicações em Medicina Regenerativa

OLIVEIRA, Ruan¹; DEIMLING, Luiz Irineu²; CAMASSOLA, Melissa²; SEIXAS, Fabiana Kömmling³; COLLARES, Tiago¹

¹ Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

² Laboratório de Células-Tronco e Terapia Gênica, Universidade Luterana do Brasil.

³ Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Contato: rsoruan@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O recente advento das pesquisas biomédicas em terapia celular e engenharia tecidual têm possibilitado novas abordagens para o tratamento futuro das doenças mais letais, como o acidente vascular cerebral e o infarto agudo do miocárdio (Segers e Lee, 2008; Banerjee *et al.*, 2011). Ainda assim, o uso de células-tronco embrionárias para tal finalidade apresenta riscos teratogênicos e questões éticas agregadas, reduzindo a aplicabilidade destas em medicina regenerativa. Como alternativa, buscam-se novas fontes de células-tronco em tecidos adultos, as quais apresentam isolamento simplificado e grande potencial terapêutico (Nardi e Camassola, 2011).

Neste âmbito, inúmeros estudos recentes indicam o tecido adiposo como local ideal para a obtenção de células multipotentes, denominadas células-tronco adiposo-derivadas (ADSCs). O rápido e crescente uso destas células em biotecnologia é justificado pelo seu fácil isolamento por lipoaspiração, o que permite terapias autólogas acopladas à perda de peso. Quando cultivadas *in vitro*, as ADSCs podem ser diferenciadas em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos e, embora menos compreendidos, hepatócitos e neurônios. Além disso, apresentam alta aplicabilidade em engenharia tecidual quando associadas a ambientes tridimensionais e fatores de crescimento, diferenciação e angiogênese (Yarak e Okamoto, 2010).

Citocinas são pequenas moléculas proteicas, secretadas por células da glia e do sistema imune que atuam inibindo ou estimulando o crescimento e a proliferação celular, além de apresentarem papel fundamental na imunomodulação e no desenvolvimento embrionário. Amplamente empregada nos processos de hepatogênese *in vitro*, a Oncostatina M (OSM) é uma citocina glicoproteica de 28 KDa que apresenta efeitos simultâneos de inibição tumoral e estímulo proliferativo de células-tronco (Song *et al.*, 2005). Ainda assim, sua dose terapêutica para uso em ADSCs não se encontra bem evidenciada e seus efeitos citotóxicos permanecem desconhecidos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi evidenciar os níveis de proliferação *in vitro* de células-tronco adiposo-derivadas humanas quando tratadas com diferentes concentrações de Oncostatina M, por tempos distintos de incubação. Por meio deste, buscou-se estabelecer a melhor concentração desta citocina para a expansão de ADSCs, possibilitando novas perspectivas à sua aplicação futura para terapia celular em larga escala.

2. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes, as células-tronco adiposo-derivadas foram isoladas de lipoaspirados, seguindo o protocolo descrito por Zachar *et al.* (2011). Após o cultivo *in vitro* por 4-5 dias, as ADSCs passaram pelos processos de caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo e diferenciação celular osteogênica, condrogênica e adipogênica, visando confirmar a multipotência das células em questão. Estas apresentaram resultados positivos para a expressão dos marcadores mesenquimais CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativos para a expressão de marcadores hematopoiéticos, como *c-kit*, CD14 e CD34 (Dominici *et al.*, 2006). Células caracterizadas como multipotentes e de origem mesenquimal foram expandidas *in vitro* para posterior utilização no experimento. Neste estudo, foram empregadas ADSCs em passagens 4 a 10, cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, em incubação a 37°C e 5% CO₂.

As células foram cultivadas nas condições acima descritas e desagregadas para posterior contagem e plaqueamento. Após a remoção do meio de cultivo e lavagem, foi realizada a tripsinização por 7 a 10 minutos. Por último, foram executados os procedimentos de contagem em Câmara de Neubauer e plaqueamento em placa de 96 poços, na concentração de $3,2 \times 10^3$ células/poço, os quais receberam 150 µL de DMEM. As células plaqueadas foram mantidas em cultivo por 24 horas para permitir a adesão celular. Então, removeu-se o meio dos poços para adicionar novos 150 µL de meio, desta vez suplementado com Oncostatina M recombinante humana (OSM) (Sigma-Aldrich, USA) nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10, 15 e 20 ng/mL, preparadas em PBS estéril. O efeito destas adições de OSM foi avaliado em três pacientes distintos, por três diferentes tempos de incubação – 24, 48 e 72 horas. Como controle negativo, utilizou-se o cultivo de ADSCs em meio não suplementado com OSM. Todos os experimentos acima foram executados em triplicata.

A análise de viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT. Depois de incubadas pelos tempos acima citados, as placas tiveram seu meio removido e foram adicionados 5 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, USA) 5 mg/mL e 45 µL de DMEM. Então, as placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 2,5 horas, possibilitando a conversão do MTT em cristais de formazan, reação catalisada por redutases mitocondriais de células viáveis. Por último, o meio foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com a adição de 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), permitindo a leitura da absorbância das amostras em leitor de placas Multiskan 347 no comprimento de onda de 540 nm.

A significância estatística dos resultados de viabilidade celular foi avaliada pela comparação entre médias, através de análises de variância (ANOVA). Estas análises e o consequente processamento gráfico dos resultados foram realizados pelo software GraphPad Prism 5.04. Foram consideradas significantes as variações com $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de absorvância das amostras foram empregados na construção de gráficos comparativos (média \pm SEM), os quais permitem observar a influência das diferentes concentrações de OSM e tempos de incubação, além da possível interação existente entre estas duas variáveis. Dentre os gráficos obtidos, destaca-se a Figura 1, a qual permite uma análise geral dos efeitos acima citados. Observando este gráfico, interpreta-se que a proliferação de ADSCs tratadas com OSM reduz à medida que o tempo de incubação aumenta, sugerindo possível efeito citotóxico desta glicoproteína às células utilizadas.

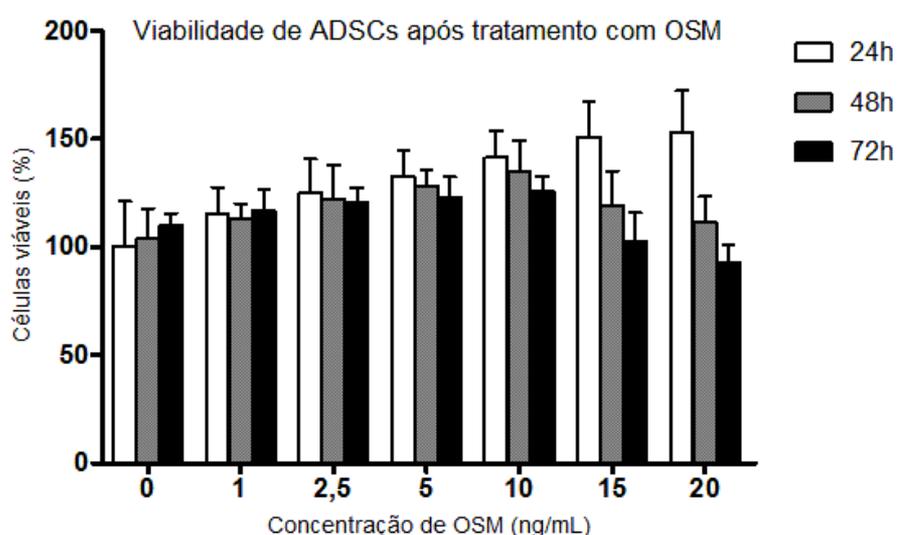


Figura 1 - Taxas de proliferação celular de células-tronco adiposo-derivadas (ADSCs) tratadas com diferentes concentrações da citocina Oncostatina M (OSM) por tempos distintos de incubação.

Quando analisado pelo teste ANOVA, o tempo de incubação apresentou diferença estatística significativa ($p=0.03$). Em contrapartida, as diferentes concentrações testadas não afetaram os resultados estatísticos de modo significativo ($p=0.15$), sugerindo a necessidade de novas repetições do experimento, a fim de aumentar o n amostral e, conseqüentemente, reduzir as variâncias observadas. Ainda assim, os resultados parciais indicam que a citocina Oncostatina M estimula a proliferação de células-tronco adiposo-derivadas, sendo este efeito proliferativo reduzido com o aumento do tempo de incubação, sugerindo um efeito citotóxico tempo-dependente.

Os resultados deste trabalho indicam que o efeito mais promissor de OSM para a expansão *in vitro* de ADSCs humanas é verificado durante a incubação por 24h, diferindo dos resultados de Song *et al.* (2005) que analisaram o tratamento por 48h. Uma breve análise do trabalho citado permite concluir que o autor avaliou a influência de diferentes tempos de incubação apenas para o tratamento com OSM 10 ng/mL, concluindo de forma precipitada sobre os efeitos tempo-dependentes da citocina em questão. Assim, o presente trabalho complementa o estudo anterior e apresenta resultados mais sólidos acerca da aplicabilidade desta glicoproteína para o aumento das taxas de proliferação de células-tronco adiposo derivadas.

4. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho possibilitou uma análise efetiva da influência da citocina Oncostatina M sobre a proliferação de células-tronco adiposo-derivadas, concluindo que os efeitos promissores desta glicoproteína são tempo-dependentes, decrescendo com o aumento do período de incubação. Assim, para a obtenção de aumentos significativos nas taxas de expansão *in vitro* de ADSCs, é recomendada a incubação por 24h em concentrações intermediárias àquelas aqui apresentadas.

Visando melhor evidenciar a concentração ideal para suplementação, novos estudos serão realizados, analisando a expressão de genes relacionados ao processo de morte celular programada. O presente resultado, somado a futuras investigações moleculares, proporcionará o completo entendimento da aplicabilidade de Oncostatina M na proliferação de células-tronco adiposo-derivadas, as quais apresentarão alta demanda nos próximos anos, fato este justificado pelo crescimento exponencial das pesquisas em terapia celular e engenharia tecidual.

5. REFERÊNCIAS

- BANERJEE, S., WILLIAMSON, D., HABIB, N., GORDON, M., CHATAWAY, J. Human stem cell therapy in ischemic stroke: a review. **Age Ageing**, v.40, p. 7-13, 2011.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315-317, 2006.
- NARDI, N.B., CAMASSOLA, M. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. **Methods Mol Biol.**, v.698, p. 151-60, 2011.
- SEGRS, V.F., LEE, R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature**, v.451, p. 937-942, 2008.
- SONG, H.Y., JEON, E.S., JUNG, J.S., KIM, J.H. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p. 2357-2365, 2005.
- YARAK, S., OKAMOTO, O.K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **An.Bras.Dermatol.**, v.85, p. 647-656, 2010.
- ZACHAR, V., RASMUSSEN, J.G., FINK, T. Isolation and growth of adipose tissue-derived stem cells. **Methods Mol.Biol.**, v.698, p. 37-49, 2011.