

# ANÁLISE MOLECULAR E CELULAR DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE ASSOCIADAS A POLÍMEROS DE GALACTOMANANA

Rafael da Silva Cezar,<sup>1</sup> Bruno Paiva dos Santos,<sup>2</sup> Michele Porto,<sup>2</sup> Nataly Siqueira,<sup>3</sup> Rosane M D Soares,<sup>3</sup> Melissa Camassola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas, ULBRA, Canoas, RS

<sup>2</sup>Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos, ULBRA, Canoas, RS

<sup>3</sup>Laboratório de Polímeros Avançados, UFRGS, Porto Alegre, RS

## INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é composto pela matriz e por células ósseas. A principal função das unidades ósseas multicelulares no esqueleto adulto é mediar o rejuvenescimento do tecido. Células-tronco derivadas de tecido adiposo (*Adipose Stem Cell* - ASC) são encontradas na fração vascular estromal do tecido adiposo como sendo células capazes de diferenciação *in vitro* em vários tipos celulares, incluindo osteoblastos. Galactomananas (GM) são polissacarídeos heterogêneos obtidos a partir do endosperma de sementes de várias dicotiledôneas. O presente projeto visa padronizar a associação das ASC de ratos Lewis com o biomaterial GM, caracterizar o potencial de diferenciação óssea das ASC associadas ao biomaterial e acompanhar a expressão gênica nesse processo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os polímeros são GM pura, gelatina pura e GM diluída em gelatina nas concentrações de GM de 0,1%; 0,3% e 0,5%. As ASC foram obtidas da região inguinal de ratos Lewis e cultivadas *in vitro*. Em seguida, foram diferenciadas (diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica), associadas aos biomateriais e testadas quanto o potencial de adesão celular. Durante este processo, será analisada a expressão de genes marcadores de diferenciação e candidatos a normalizadores (Tabelas 1 e 2) usando PCR em tempo real. Os polímeros de GM foram testados quanto à sua possível citotoxicidade por teste de contato direto usando células L929 por 24h e 48h segundo normas da ISO 10993-5. A adesão celular foi feita usando 3x10<sup>5</sup> células com tempo de incubação de 3 horas sob 2 cm<sup>2</sup> do biomaterial.

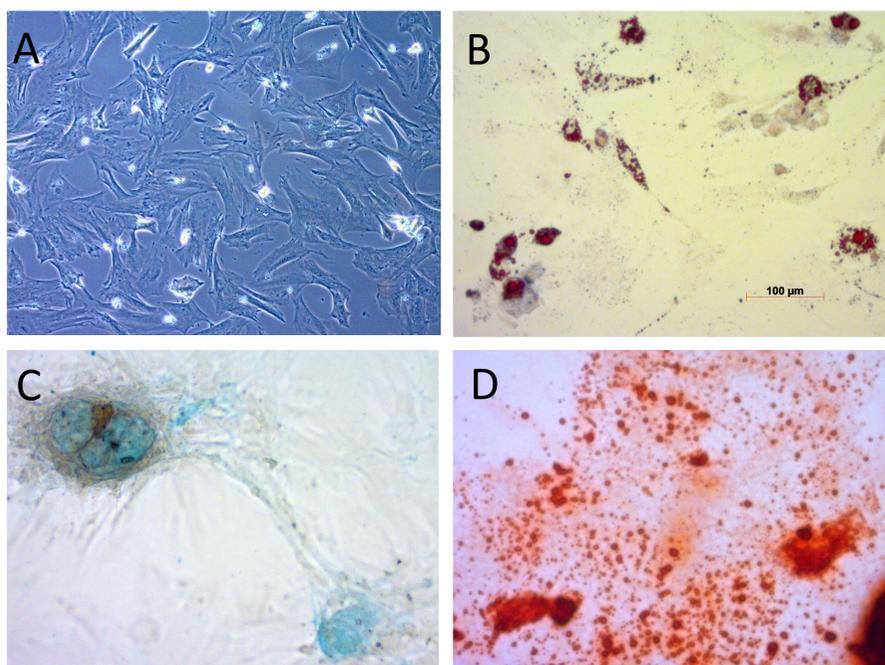


Figura 1. Cultivo de ASC de rato Lewis. (A) ASC indiferenciadas. (B) ASC submetidas à diferenciação adipogênica. (C) ASC submetidas à diferenciação condrogênica. (D) ASC submetidas à diferenciação osteogênica e coradas com Alizarina.

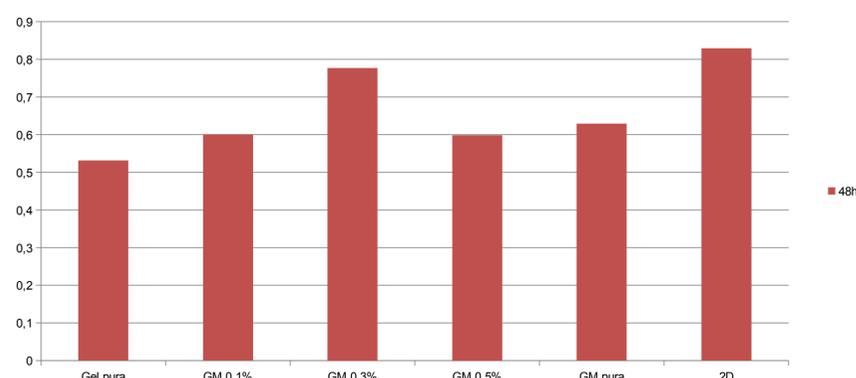


Figura 2. Ensaio de citotoxicidade por contato direto de acordo com ISO 10993-5 em polímeros de GM pura, gelatina pura (gel pura) e GM diluída em gelatina nas concentrações de GM de 0,1%; 0,3% e 0,5%. O controle é representado pela ausência de biomaterial (cultivo 2D).

## RESULTADOS

As ASC isoladas são capazes de proliferar e diferenciar *in vitro* (controle, adipo-, condro-, osteogênese) em ambiente bidimensional (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D, respectivamente). O RNA dessas diferenciações foram extraídos e cDNA sintetizado. Quanto aos polímeros de GM, eles não se mostraram citotóxicos (Figura 2). As ASC aderiram aos polímeros em diferentes concentrações de GM nas seguintes taxas: 97,36% em gelatina pura; 98,56%; em GM 0,1%; 98,2% em GM 0,3%; 93,95% em GM 0,5% e 99,06% em GM pura (Figura 3).

Tabela 1. Genes a serem analisados como marcadores de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica.

Genes	Proteína	Osteogênese	Adipogênese	Condrogênese
BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	X		
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	X		
RUNX2	runt related transcription factor 2	X		
PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	X		
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	X		
LPL	lipoprotein lipase		X	
COL10A1	collagen, type X, alpha 1			X
COL2A1	collagen, type II., alpha 1			X
SOX9	SRY-box containing gene 9			X

Tabela 2. Genes a serem analisados como candidatos a normalizadores da expressão gênica.

Genes	Proteína	Função
ACTB	actin, beta	motilidade celular e citocinese
B2M	beta-2 microglobulin	componente do MHC
TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	metabolismo do ferro
GUSB	glucuronidase, beta	hidrólise do ácido B-D-glucurônico
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	geração de novas purinas da degradação de DNA
TUBB5	tubulin, beta 5 class I	componente do citoesqueleto
RPL13A	ribosomal protein L13a	componente da subunidade 60S do ribossomo
TBP	TATA box binding protein	iniciação da transcrição
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	transdução de sinais
PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Cataliza o dobramento de proteínas
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	respiração celular
UBC	ubiquitin C	catabolismo de proteínas
RPLP0	ribosomal protein, large, P0	proteína estrutural do ribossomo
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	processos metabólicos e não metabólicos tal como glicólise, ativação da transcrição e apoptose
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	transferase envolvida na glicólise/cataliza a formação de ATP
RPL5	ribosomal protein L5	requerido para a maturação de rRNA e formação da subunidade 60S do ribossomo
H2AFZ	H2A histone family, member Z	membro da família H2A das histonas
TKT	Transketolase	envolvido em rotas metabólicas e das pentoses fosfato
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	envolvido em rotas metabólicas

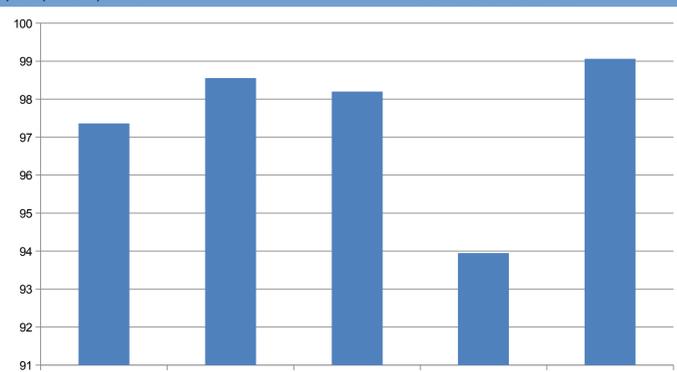


Figura 3. Porcentagem de adesão celular nos polímeros de GM.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

GM é um biomaterial com potencial para ser aplicado na engenharia de tecidos por não se mostrar citotóxico e, nele, as ASC apresentaram boa taxa de adesão. As células serão caracterizadas quanto à expressão gênica e proliferação sob os polímeros de GM. Com esses dados, poderemos definir as concentrações de GM mais adequadas para serem associadas às ASC que serão induzidas à diferenciação osteogênica e implantadas lesões ósseas *in vivo*.