

# ANAIS

## EICTI 2017

6° Encontro de  
Iniciação Científica

2° Encontro de Iniciação  
ao Desenvolvimento  
Tecnológico e Inovação

4 a 6 de outubro de 2017

Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)  
Av. Tarquínio Joslin dos Santos, nº 1000  
Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil



Realização:



Apoio:



# INTERAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS E SEUS DERIVADOS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE ORIGEM HEMATOLÓGICO *IN VIVO* E *IN VITRO*.

**DELGADO, Nathália Felipe.**

Estudante do Curso de Biotecnologia, bolsista (IC-UNILA) - ILACVN – UNILA;  
E-mail: [nathalia.delgado@aluno.unila.edu.br](mailto:nathalia.delgado@aluno.unila.edu.br)

**RUIZ, Jorge Luis Maria**

Docente/pesquisador do curso Biotecnologia – ILACVN – UNILA.  
E-mail: [jorge.ruiz@unila.edu.br](mailto:jorge.ruiz@unila.edu.br)

## 1 INTRODUÇÃO

As principais características das células-tronco mesenquimais (CTMs) são a capacidade de auto renovação e de diferenciação em diversos tipos celulares, exercendo uma função regenerativa dos tecidos lesionados gerando interesses terapêutico na medicina regenerativa. Outra aplicação relevante das CTMs é nos transplantes de medula óssea, após a quimioterapia de pacientes com câncer pelas suas propriedades imunossupressoras. No entanto, existem alguns estudos controversos na literatura mostrando que as CTM podem aumentar *in vitro* e *in vivo* a proliferação de linhagens tumorais e em outros casos inibi-la. O presente estudo buscou identificar os efeitos das células-tronco mesenquimais de diferentes fontes e dos meios condicionados produzidos por elas sob células tumorais de linhagem hematológica, por via de metodologias como ensaio de viabilidade celular, análise de morte celular por apoptose e análise de expressão de citocinas.

Os experimentos foram realizados utilizando as células K562-Lucena (LMC resistente a vincristina).

## 2 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram realizados nas dependências do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Cultura celular:** Isolou-se 3 linhagens de CTMs humanas no LIM-31 da FMUSP. CTMs de geleia de Wharton (CU), líquido amniótico (LA) e tecido adiposo (TA). As CTMs foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil). As células tumorais hematológicas: K562-Lucena (LMC resistente a vincristina) foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. Todas suplementadas com penicilina 100U/ml, estreptomicina 100

µg/ml (Sigma-Aldrich®, EUA) e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Forma, EUA).

**Meios condicionados (MC):** Os meios condicionados (MC) de CTMs foram obtidos a partir de culturas e MSCs, a 80% de confluência, mediante incubação com meio α-MEM 10 % de SFB. Após 24 h de incubação, o MC foi separado, centrifugado e filtrado (0,45 µM). O pH e a osmolaridade foram corrigidos, e os MCs alíquotados e estocados a -20 °C.

**Ensaio de Viabilidade Celular:** Células de tumores hematológicos cultivadas em meio de α-MEM foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, EUA) com 1x10<sup>3</sup> células por poço. Incubou-se as células com concentrações de MCs de diferentes origens (de 0.01% a 100 %) por 24 horas. Após 24 horas acrescentou-se 10 µL de solução MTT e, após 4 h, os cristais de formazam dissolveu-se com dimetilsulfóxido (DMSO) e a viabilidade celular foi determinada por quantificação da absorbância a 570 nm e 630 nm em espectrofotômetro (Spectramax Paradigm® Molecular Devices, LLC).

**Análise de morte celular por apoptose:** A indução de morte celular por apoptose foi estudada utilizando o marcador de apoptose inicial com o kit Annexin-V/PI (BD Pharmigem, USA) que detecta exteriorização de fosfatidilcolina. As células tumorais (1x10<sup>4</sup> cel/poço em placa de 96 poços) foram tratadas por 24 h com MCs, na concentração determinada nos experimentos de viabilidade celular que induz a menor viabilidade. Corou-se as células com 1µL de anexina V e 0,5 µL de iodeto de propídio (PI) e incubadas, protegidas da luz. As placas foram adquiridas por microscopia de fluorescência no ImageXpress® Micro XL (Molecular Devices, LLC).

**Análise de expressão de citocinas.** Para analisar a presença de citocinas no MC foi utilizado o kit Human Cytokine Array Kit, Panel A (R&D Systems) para detectar até 36 citocinas, quimosinas e proteínas de fase aguda seguindo instruções do fabricante.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são um tipo de células-tronco (CT) adulta. Existem diversos estudos profundos relacionados sobre a sua biologia, o que permite a utilização das CTMs nas clínicas com segurança. As CTMs são encontradas em uma diversidade de tecidos tais como: medula óssea, no tecido adiposo, no sangue periférico, na polpa dental em tecidos adultos, nos tecidos fetais e perinatais como o sangue do cordão umbilical, o líquido amniótico, e a geleia de

Wharton. Dentre de suas principais características destacam-se a capacidade de auto renovação e de diferenciação em diversos tipos celulares, (BYDLOWSKI, DEBES, MASELLI, JANZ, 2009) exercendo uma função regenerativa de tecidos lesionados. *In vitro* as CTMs têm a facilidade de isolamento, alta capacidade de proliferação e um potencial elevado de diferenciação celular (HWANG,2009). Essas características das CTMs têm atraído interesses no seu uso terapêutico na medicina regenerativa. (BYDLOWSKI, DEBES, MASELLI, JANZ, 2009) (HWANG, 2009) (BATTIWALLA; HEMATTI, 2009).

Atualmente, as CTMs têm relevância predominantemente nas clínicas de transplantes, particularmente no transplante de medula óssea após quimioterapia em pacientes oncológicos, na qual servem de sustentação para as células-tronco hematopoiéticas que irão reconstituir o sistema hematopoiético afetado pelo tratamento quimioterápico. Além disso as CTMs apresentarem uma vantagem de regulação do sistema imune, (BYDLOWSKI, DEBES, MASELLI, JANZ, 2009) que possibilita evitar a rejeição do tecido ou órgão transplantado pelo hospedeiro (HWANG,2009) dessa forma pode reduzir a doença do enxerto contra hospedeiro, na qual é responsável pelo os fracassos nos transplantes (BATTIWALLA; HEMATTI, 2009).

Existem relatos controversos na literatura indicando que as CTMs podem aumentar *in vitro* e *in vivo* a proliferação de linhagens tumorais e em outros casos inibi-la. Entretanto, há indícios de que o comportamento das CTMs está relacionado ao ambiente na qual se encontra e também de acordo com sua origem, porém, existem poucas informações a respeito dos mecanismos moleculares que ligam as CTMs ao microambiente do tumor ou sobre como a CTMs regulam fenótipos de células tumorais. Para uma melhor elucidação da interação das CTMs com câncer, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre esse tema. Tendo em vista a importância de se estudar mais a relação CTMs e células tumorais, a presente pesquisa teve como objetivo analisar os efeitos dos meios condicionados produzidos pelas CTMs de diferentes fontes sob células tumorais de linhagem hematológica, dessa maneira, coletando dados que poderão auxiliar no desenvolvimento de futuras pesquisas.

#### **4 RESULTADOS**

As análises feitas por microscopia de fluorescência permitiram determinar que alguns meios condicionados tiveram um efeito inibidor na proliferação celular em

células K562-Lucena. MC derivado de tecido adiposo e cordão umbilical diminuíram a viabilidade celular. Esta diminuição de células pode ser devida o efeito citostático ou citotóxico dos componentes do MC. Dado que não foi encontrado um aumento significativo de apoptoses ou necroses nos tratamentos com estes meios, o primeiro mecanismo é mais provável.

A análise de microarranjo de Citocinas do meio condicionado de células tumorais K562-Lucena e de meio condicionado de células-tronco de tecido adiposo mostrou-se a expressão diferencial de um grupo de Citocinas.

## 5 CONCLUSÕES

Os MCs de células-tronco mesenquimais afetam a proliferação celular de células tumorais K562-Lucena em diferente grau dependendo na sua origem. O meio condicionado de célula-tronco mesenquimais possui vários tipos de citocinas que normalmente não são encontradas no meio das células tumorais indicando um possível mecanismo de ação.

## 6 REFERÊNCIAS PRINCIPAIS

HWANG, Nathaniel S et al. **Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine.** Wiley Interdiscip, Rev Syst Biol Med 1, 97–106 (2009).

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. **Características biológicas das células-tronco mesenquimais.** Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia, São Paulo, Epub, v.31, n.1, Jun/2009.

BATTIWALLA, Mino; HEMATTI, Peiman. **Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation,** 2009.