

Efeito do Envelhecimento na Expansão *In Vitro* de Células Hematopoéticas da Medula Óssea

Effect of Aging on the *In Vitro* Expansion of Bone Marrow Hematopoietic Cells

ALESSANDRA MARINHO MIRANDA⁴
FERNANDA GINANI⁴
CARLOS AUGUSTO GALVÃO BARBOZA⁴

RESUMO

Objetivo: o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do envelhecimento sobre a capacidade proliferativa de células hematopoéticas obtidas da medula óssea de camundongos. **Material e Métodos:** foram comparados dois grupos de animais: jovens (30 dias de idade) e senis (18 meses de idade). Extratos de medula óssea foram coletados do canal medular de tibia e fêmur dos animais e as células hematopoéticas foram cultivadas e contadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. **Resultados:** os resultados demonstraram que nos animais jovens a curva de crescimento celular mostrou tendência proliferativa, porém nos animais senis essa curva se mostrou decrescente, com uma queda acentuada no intervalo de 72 horas de cultivo. **Conclusão:** conclui-se que a idade avançada do animal exerceu uma influência negativa no rendimento *in vitro* de células hematopoéticas da medula óssea, o que pode representar um fator importante a ser considerado nos protocolos que utilizam essas células para terapia de doenças do sistema hematopoético.

DESCRIPTORIOS

Medula óssea. Hematopoese. Envelhecimento.

SUMMARY

Objective: This study aimed to evaluate the influence of aging on the proliferative capacity of hematopoietic cells obtained from mice bone marrow. **Material and Methods:** two groups of animals were compared: young (30 days old) and senile (18 months old). Bone marrow extracts were collected from the medullary cavity of the tibia and femur of the animals and the hematopoietic cells were cultured and counted in intervals of 24, 48 and 72 hours. **Results:** The results demonstrated that in young animals the growth curve of the cells showed a proliferative trend, but in senile animals it was observed a decreasing curve, with an intense fall in the 72 hours interval. **Conclusion:** it's concluded that the advanced age of the animal exerts a negative influence in the *in vitro* yield of bone marrow hematopoietic cells, which may represent an important factor to be considered in protocols that use those cells for therapy of diseases affecting the hematopoietic system.

DESCRIPTORS

Bone marrow. Hematopoiesis. Aging.

1 Biomédica. Aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia da Universidade Potiguar.

2 Aluna de Graduação em Biomedicina e Bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Morfologia da UFRN.

3 Doutor em Patologia Bucal. Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFRN.

A hematopoese é um processo importante na manutenção das células sanguíneas, que constantemente estão sendo produzidas e destruídas. Para que ocorra esse processo de renovação das células do sangue é necessária a existência das células-tronco hematopoéticas, que dão origem a todos os tipos celulares que constituem o sistema hematopoético, e das células progenitoras hematopoéticas, que podem ser de potencial multilinhagem ou de linhagem única. As células-tronco hematopoéticas presentes na medula óssea representam por volta de 0,01% a 0,005% de todas as células ali presentes (SZILVASSY, HOFFMAN, 1995; THOMAS, MILLER, EAVES, 1999), enquanto que as progenitoras representam em torno de 0,1% (SZILVASSY, HOFFMAN, 1995).

Vários estudos *in vitro* têm sido realizados com células-tronco hematopoéticas e progenitoras na tentativa de conseguir aumentar a quantidade de células que mantenham a capacidade de dar origem a todas as células do sistema hematopoético e de expandir seu número. A finalidade de tais estudos que envolvem a expansão dessas células *in vitro* é a manipulação molecular das mesmas, o que permite o desenvolvimento de terapias gênicas e moleculares para uma grande variedade de doenças. Tais procedimentos têm como finalidade a realização de futuros transplantes que obtenham sucesso em pessoas com distúrbios hematopoéticos (MAYANI, ALVARADO-MORENO, FLORES-GUZMÁN, 2003).

O envelhecimento é descrito por VAN ZANT, LIANG (2003) como o aumento da possibilidade de morte ao longo do tempo. Os autores defendem duas grandes teorias para o envelhecimento, são elas: evolucionária e a baseada nos danos sofridos. A primeira acredita na seleção natural para genes que beneficiem a reprodutibilidade (fecundidade), dessa forma a seleção inicial poderia causar uma seleção secundária de genes relacionados ao aumento da longevidade, o que aumentaria o período de proliferação (fecundidade). A segunda preconiza que o acúmulo de danos celulares limita o funcionamento ideal de um organismo, limitando assim sua longevidade.

A união dessas duas teorias sugere que a expressão controlada da telomerase nas células hematopoéticas faz com que, ao longo do tempo e com as inúmeras divisões realizadas, os telômeros dessas células sejam encurtados, aumentando a probabilidade de morte celular. Esse fenômeno não ocorre com os linfócitos B, que apesar de serem células que pertencem

ao sistema hematopoético, expressam uma maior quantidade de telomerase com o objetivo de permitir maior número de divisões e assim serem capazes de aumentar a afinidade de anticorpos produzidos contra antígenos exógenos (VERFAILLIE, PERA, LANSDORP, 2002). Na mesma linha, VAN ZANT, LIANG (2003) e HAYFLICK (2007) propuseram duas causas para o envelhecimento celular: envelhecimento como resultado de processos ao acaso devido ao acúmulo de danos ou como resultado de processos programados pela expressão diferenciada dos genes.

A partir deste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do envelhecimento sobre a capacidade de proliferação de células hematopoéticas da medula óssea de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da 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 (trinta dias de idade) e cinco senis (18 meses de idade), obtidos do Laboratório de Cronobiologia da UFRN. Os animais foram submetidos a eutanásia com dose letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg peso, via intraperitoneal) e dissecados para remoção dos fêmures e tíbias. Os ossos recém-dissecados foram mantidos em tubos tipo Falcon contendo uma solução hipotérmica (4°C) de tampão fosfato básico (PBS) acrescida de 0,5 mg/mL de gentamicina (Gibco, EUA) e 3 mg/mL de anfotericina B (Gibco, EUA).

Em uma câmara de fluxo laminar e sob condições assépticas, foram feitos cortes nas epífises dos ossos com auxílio de uma tesoura de ponta reta e, utilizando uma seringa de 1 mL, a medula foi extraída através da inserção da agulha no canal medular e posterior lavagem do canal, utilizando meio de cultura básico alfa-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 (Cultilab, Brasil).

O extrato total de medula foi cultivado por 24 horas, para permitir a aderência das células mesenquimais à placa de cultura. Com este procedimento, as células hematopoéticas permanecem livres, pois não conseguem se aderir ao plástico (PERES, CURI, 2005). Decorrido esse tempo, uma alíquota de meio foi retirada da placa de cultura para a contagem de células hematopoéticas viáveis através do uso do Azul de

Tripan.

Para avaliar a proliferação das células hematopoéticas da medula óssea, estabelecendo-se uma curva de crescimento celular nos dois grupos, alíquotas contendo 2×10^4 células de cada grupo foram depositadas em placas de cultura com 35mm de diâmetro (TTP, USA) e cultivadas em três períodos de tempo: 24, 48 e 72 horas. A cada intervalo de tempo, as células foram submetidas a contagem em hemocitômetro.

Os dados obtidos no ensaio de proliferação celular foram submetidos a análise não paramétrica através do software GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, USA). Cada valor das contagens celulares correspondeu à média \pm dp (desvio padrão da média) de três amostras por intervalo em cada grupo. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de 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 na figura 1. Após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis, observou-se diferença estatística entre os grupos ($p = 0,0021$).

Realizada a análise do crescimento celular dos diferentes estágios de maturidade dos animais em um mesmo intervalo de tempo, observamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos jovens e senis, no intervalo de 72 horas (Figura 1).

A análise da curva de crescimento celular mostrou tendências diferentes das células hematopoéticas da medula óssea de camundongos em diferentes idades no decorrer do tempo experimental. Nos animais jovens, a curva de crescimento mostrou que no intervalo entre os períodos de 24 e 48 horas é visível a continuação do crescimento celular, podendo ser considerado o período de 48 horas como o pico de crescimento (Figura 2). Já no intervalo entre 48 e 72 horas observou-se uma ligeira queda no crescimento.

A curva de crescimento dos camundongos senis no intervalo entre os períodos de 24 e 48 horas apresenta uma queda brusca na proliferação celular que continua no intervalo entre 48 e 72 horas (Figura 2).

A análise estatística das médias de crescimento celular em ambos os grupos revelou diferenças significativas entre os intervalos de tempo de 24 e 72 horas (Figura 2).

DISCUSSÃO

O transplante de células tronco tem sido aperfeiçoado ao longo dos anos. Teve início com o

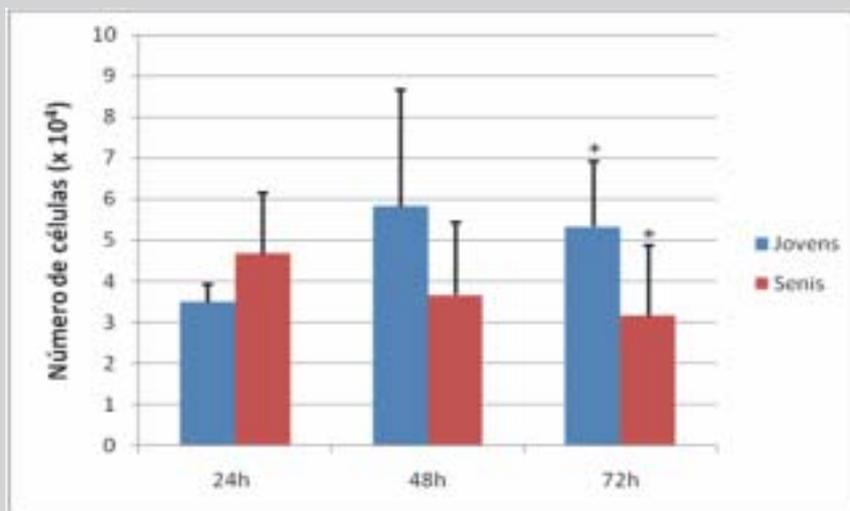


Figura 1. Médias e desvios padrões do crescimento celular nos dois grupos experimentais, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. * $p = 0,0045$ (teste de Mann-Whitney).

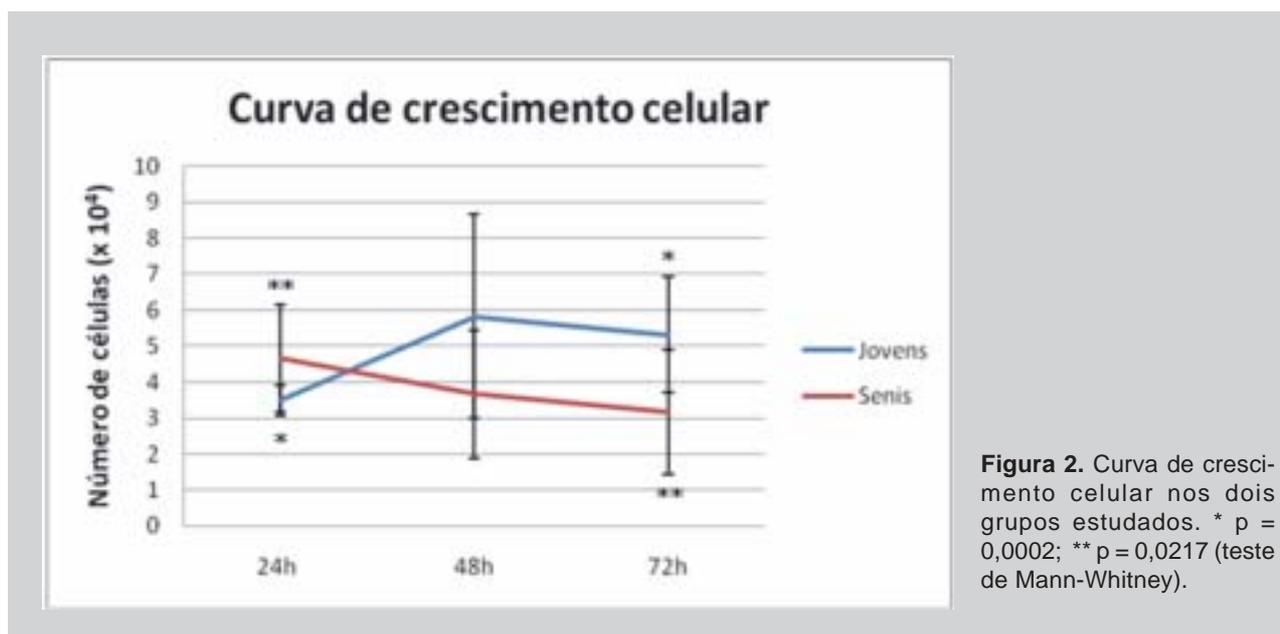


Figura 2. Curva de crescimento celular nos dois grupos estudados. * $p = 0,0002$; ** $p = 0,0217$ (teste de Mann-Whitney).

transplante de células de origem da medula, depois a partir do sangue periférico (mobilização celular) e progrediu até a utilização de células do cordão umbilical. Com o advento da terapia celular, estudos têm sido realizados com o cultivo dessas células *ex vivo*, com o objetivo de manipulá-las de forma celular e molecular. Nesses estudos há a possibilidade de expansão de um conjunto de células-tronco hematopoéticas (CTH) purificadas fazer uso de citocinas que dão origem a determinados tipos de progenitores ou ainda desenvolver células em seu nível de maturação final. Outra utilidade do cultivo *ex vivo* é a manipulação genética dessas células; o tratamento de imunodeficiências combinadas através de transplantes de CTH modificadas geneticamente é um exemplo do emprego desses estudos. Fica claro que a terapia celular também irá revolucionar o uso de CTH para o tratamento de patologias hematológicas (MAYANI, 2003).

O envelhecimento ou senescência celular tem sido uma preocupação em pesquisas que visam a expansão das células hematopoéticas *ex vivo*, pois pode afetar os estudos realizados de maneira negativa, já que a literatura mostra que após várias divisões essas células não guardam o mesmo potencial proliferativo e de diferenciação que possuíam inicialmente (VERFAILLIE, PERA, LANSDORP, 2002; MAYANI, 2010; VICKERS *et al.*, 2000; ALVARADO-MORENO *et al.*, 2007; SCHIBLER

et al., 1994; MAJKA *et al.*, 2001; JANOWSKA-WIECZOREK *et al.*, 2001; NG *et al.*, 2004; OH, LAU, EAVES, 2000). A perda dessas características pode comprometer o uso dessas células em um futuro transplante, uma vez que elas não teriam a capacidade de restaurar de modo eficiente o tecido hematopoético do paciente que as recebessem.

Como resultado do presente estudo comparativo entre as culturas das células hematopoéticas de camundongos jovens e senis, considerando o intervalo de tempo de 24, 48 e 72 horas, observou-se uma curva de crescimento celular na qual pôde ser notado que as células obtidas de camundongos jovens continuaram a apresentar uma tendência de proliferação. Por outro lado, as células dos animais senis somente conseguiram manter uma proliferação considerável nas primeiras 24 horas e, após esse período, houve um declínio da proliferação celular. A diferença verificada entre os grupos jovens e senis pode ser justificada através de vários fatores que agem de maneiras distintas durante a senescência celular, principalmente o tamanho do telômero, o ciclo celular, a produção e a respostas às citocinas, e o padrão de expressão gênica (VAN ZANT, LIANG, 2003).

Pode-se afirmar que as células hematopoéticas dos camundongos jovens possuem um telômero maior quando comparadas aos camundongos senis. Esse fato

pode ser justificado por uma menor quantidade de divisões sofridas pelas células mais jovens, uma vez que quanto maior o número de divisões sofridas, menor será o tamanho do telômero (VERFAILLIE, PERA, LANSDORP, 2002), devido a sua replicação incompleta da extremidade 3' (MAYANI, 2010). O encurtamento do telômero leva as células a terem uma maior probabilidade de morte, devido a sua capacidade de manter a estabilidade celular, fator importante à sobrevivência das células (VAN ZANT, LIANG, 2003). Esse fato pode ser comprovado pela brusca queda vista na curva de crescimento dos animais senis.

Sobre o ciclo celular das células hematopoéticas dos camundongos jovens é possível afirmar que possuem uma atividade replicativa maior em relação aos animais senis, visto que após as 72 horas ainda apresentavam tendência de proliferação, enquanto que os senis já tinham sua proliferação diminuída. A maior atividade dessas células pode estar relacionada ao fato de que as células mais jovens possuem um ciclo celular mais acelerado (MAYANI, 2010), e pesquisadores têm correlacionado isso a um aumento no nível de algumas ciclinas e ciclinas quinases dependentes (ALVARADO-MORENO et al., 2007).

As diferenças encontradas entre os grupos jovem e senil no presente estudo podem também estar relacionados à diferença na capacidade de produção e resposta às citocinas pelas células hematopoéticas. A proliferação inicial de ambos os grupos celulares estudados pode ser explicada pela persistência de componentes da matriz extracelular e entre eles as citocinas, que impulsionariam essas células à sobrevivência e proliferação. Visto que esses componentes com certo tempo se esgotam, a sobrevivência dependeria da produção independente por parte das células hematopoéticas ali presente. SCHIBLER *et al.* (1994) relatam a produção de citocinas, tanto pelas células mais jovens, quanto pelas adultas; a diferença existente seria a maior capacidade de produção pelas células jovens, o que explicaria a queda na proliferação das células dos animais senis e a tendência de proli-

feração das células dos animais jovens. Além do maior potencial de produção de citocinas, as células mais jovens possuem maior capacidade de responder a essas citocinas, como foi relatado por WEEKX *et al.* (1998).

Outra explicação plausível para a maior capacidade de proliferação vista nas células dos camundongos jovens é a diferença existente no padrão de expressão celular de células jovens e senis. Uma vez que, segundo NG *et al.* (2004), as células jovens expressam altos níveis de fatores de transcrição que colaboram com a sua maior capacidade proliferativa. Em adição a esses achados, OH, LAU, EAVES (2000) verificaram nas células de indivíduos jovens uma alta expressão de receptores de citocinas (o que explicaria a maior capacidade das células jovens em responder a tais indutores de proliferação), do fator de transcrição c-myc (que inibe a expressão do inibidor de cdk p21) e do gene Id (relacionado ao estímulo à proliferação celular); enquanto que nas células de adultos todos esses genes estavam em menor expressão.

Os resultados aqui encontrados mostram que a idade pode representar um fator importante a ser considerado nos protocolos que utilizam células-tronco hematopoéticas para terapia de hemopatias, uma vez que o envelhecimento traria consequências negativas a terapias celulares *ex vivo* (melhoramento genético e expansão numérica de células hematopoéticas) seguidas de transplantes. Estudos posteriores avaliando detalhes moleculares da relação entre a capacidade proliferativa das células hematopoéticas e o envelhecimento poderão contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na proliferação *in vitro* e *in vivo* dessas células.

CONCLUSÕES

Concluimos que a idade avançada do animal exerce uma influência negativa no rendimento *in vitro* de células hematopoéticas da medula óssea, nas primeiras 72 horas de cultivo analisadas.

REFERÊNCIAS

1. ALVARADO-MORENO A, CHÁVEZ-GONZÁLEZ A, CÉRBULO A, ARRIAGA L, MAYANI H. Cell cycle differences in vitro between primitive hematopoietic cell populations from adult and umbilical cord blood. *Stem Cells Dev*, 16(2): 223-230, 2007.
2. HAYFLICK L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci*, 1100(1): 1-13, 2007.
3. JANOWSKA-WIECZOREK A, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells*, 19(2): 99-107, 2001.
4. MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, EHRENMAN K, PIETRZKOWSKI Z, KOWALSKA MA, GEWIRTZAM, EMERSON SG, RATAJCZAK MZ. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97(10): 3075-3085, 2001.
5. MAYANI H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res*, 34(1): 3-15, 2003.
6. MAYANI H, ALVARADO-MORENO JA, FLORES-GUZMÁN P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res*, 34(6): 476-488, 2003.
7. MAYANI H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 19(3): 285-298, 2010.
8. NG YY, VAN KESSEL B, LOKHORST HM, BAERT MR, VAN DEN BURG CM, BLOEM AC, STAAL FJ. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J Leukoc Biol*, 75(2): 314-323, 2004.
9. OH IH, LAU A, EAVES CJ. During ontogeny primitive (CD34+)CD38(-) hematopoietic cells show altered expression of a subset of genes associated with early cytokine and differentiation responses of their adult counterparts. *Blood*, 96(13): 4160-4168, 2000.
10. PERES CM, CURI R. *Como Cultivar Células*, 1ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, 304 p.
11. SCHIBLER KR, LI Y, OHLS RK, NYE NC, DURHAM MC, WHITE W, LIECHTY KW, LE T, CHRISTENSEN RD. Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood*, 84(11): 3679-3684, 1994.
12. SZILVASSY SJ, HOFFMAN R. Enriched hematopoietic stem cells: basic biology and clinical utility. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1(1): 3-17, 1995.
13. THOMAS TE, MILLER CL, EAVES CJ. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods*, 17(3): 202-218, 1999.
14. VAN ZANT G, LIANG Y. The role of stem cells in aging. *Exp Hematol*, 31(8): 659-672, 2003.
15. VERFAILLIE CM, PERA MF, LANSDORP PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002(1): 369-91, 2002.
16. VICKERS M, BROWN GC, COLOGNE JB, KYOIZUMI S. Modelling haemopoietic stem cell division by analysis of mutant red cells. *Br J Haematol*, 110(1): 54-62, 2000.
17. WEEKS SF, VAN BOCKSTAELE DR, PLUM J, MOULIJNA, RODRIGUS I, LARDON F, DE SMEDT M, NIJS G, LENJOU M, LOQUET P, BERNEMAN ZN, SNOECK HW. CD34++ CD38- and CD34+ CD38+ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenetic source. *Exp Hematol*, 26(11): 1034-42, 1998.

Correspondência

Carlos Augusto Galvão Barboza
 Av. Salgado Filho, 3000 – Campus Universitário
 59072-970 Natal – Rio Grande do Norte – Brasil

E-mail

cbarboza@cb.ufrn.br