

Artigo de revisão

Letícia Lorryne da Silva Soares¹
Napoleão Martins Argolo Neto¹
Maria Acelina Martins de Carvalho¹

Análise citogenética de células-tronco mesenquimais em cultivo prolongado: uma revisão

Cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells in prolonged cultivation: a review

A B S T R A C T

Stem cells (CT) are a constitute group of undifferentiated cells, characterized by property of originating specialized and self-renewing cells. Among adult stem c mesenchymal stem cells (MSC) which has aroused of particular interest, due to their plasticity, with the ability to originate cells of mesenchymal and non-mesenchymal lin in the body. These cells can be expanded for more than 40 generations while maintai multipotent capacity, however, prolonged in vitro culture procedures can cause a reduc in mitosis rates and a high probability of accumulation of mutations, characterizi genetic instability. This work comes to a review on the genetic stability of MSC in l term cultivation and the importance of cytogenetic methods. A search was performe the online databases of Google Scholar, PubMed and SciELO, using the expressi "cytogenetic analysis", "mesenchymal stem cells" and "chromosomal aberrations". therapeutic use of CTM requires quality control, safety and traceability programs. Thi is necessary to use cytogenetic tests such as: Banding G analysis, considered the standard in conventional cytogenetics; "Comet Assay" technique, standard for asses DNA damage and repair; and the Micronucleus Test, which analyzes chromosom instability. There is no consensus as to the most appropriate methods and paramete certify the safety of MSCs grown in vitro, requiring additional studies and methodological approaches, such as molecular analyzes.

¹. Universidade Federal do Piauí

R E S U M O

As células-tronco (CT) constituem um grupo de células indiferenciadas, caracterizado pela propriedade de originar células especializadas e de autorrenovação. Dentre as células tronco adultas, as células-tronco mesenquimais (CTM) compõem um grupo que vem despertando particular interesse, devido a sua elevada plasticidade, com a capacidade de originar, no organismo, células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal. Essas células podem ser expandidas por mais de 40 gerações, mantendo capacidade multipotente; no entanto, os procedimentos de cultivo prolongado *in vitro*, podem provocar redução nas taxas de mitose e uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, caracterizando uma instabilidade genética. Este trabalho trata de uma revisão sobre estabilidade genética das CTM, em cultivo prolongado, e a importância dos métodos citogenéticos. Foi realizada uma busca nas bases de dados on-line do Google Scholar, PubMed e SciELO, por meio das expressões, "análise citogenética", "células-tronco mesenquimais" e "aberrações cromossômicas". O uso terapêutico de CTM requer programas de controle para qualidade, segurança e rastreabilidade. Assim, é necessário o uso de testes citogenéticos como: análise em Bandeamento G, considerada padrão-ouro na citogenética convencional; técnica de "Ensaio do Cometa", padrão para avaliar os danos e reparação no DNA; e o Teste de Micronúcleo, que analisa a instabilidade cromossômica. Não há consenso quanto aos métodos e aos parâmetros mais adequados para atestar a segurança das CTM, cultivadas *in vitro*, sendo necessários estudos adicionais e novas abordagens metodológicas, como análises moleculares.

K E Y W O R D S

Cytogenetic Analysis; Mesenchymal Stem Cells; Chromosomal Aberrations. P A L A V R A S - C H A V E

Análise Citogenética; Células-Tronco Mesenquimais; Aberrações Cromossômicas.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Letícia Lorryne da Silva Soares
<leticyalorryne-12@hotmail.com>
Avenida Antônio Pedreira Martins Nº 5871, Alto Alegre, CEP 64008 – 190, Teresina-PI - Brasil

INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) constituem grupo de células indiferenciadas, caracterizadas pela propriedade de originar células especializadas e de autorrenovação (CHEUNG e RANDO, 2013). As células-tronco têm sido classificadas em dois grupos: células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA) (ROCHA et al., 2012). As CTA se dividem em células-tronco mesenquimais (CTM) e células-tronco hematopoiéticas (CTH) (BIANCO et al., 2008).

Dentre as CTA, as CTM compõem um grupo que vem despertando particular interesse, devido a sua elevada plasticidade, podendo originar, no organismo, células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal (MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2010). Essas células se tornaram uma alternativa terapêutica atrativa, com amplo espectro de aplicações clínicas, no contexto de terapia celular, sendo caracterizadas por possuírem potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogênica, adipogênica, condrogênica; pela capacidade de proliferação; pelo crescimento *in vitro* aderido ao plástico e por apresentarem morfologia semelhante a fibroblastos (BYDLOWSKI et al., 2009). Ademais, possuem propriedades imunossupressoras e são capazes de secretarem moléculas bioativas que exercem efeitos tróficos, que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica (MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2010).

Devido a essas características, as CTM têm sido consideradas uma fonte atrativa de regeneração tecidual (KINGHAM et al., 2007). Podem ser expandidas por mais de 40 gerações, mantendo capacidade multipotente, porém os procedimentos de cultivo prolongado *in vitro* podem provocar redução nas taxas de mitose e grande probabilidade de acúmulo de mutações, caracterizando instabilidade genética. Assim sendo, é desaconselhável seu uso clínico nessas condições (DEANS, MOSELEY, 2000).

O comprometimento da integridade genética representa um risco a ser considerado nos procedimentos de terapia celular (MALAGUTTI-FERREIRA, 2016). É importante a identificação de anormalidades cromossômicas em CT com potencial uso terapêutico, uma vez que, *in vivo*, os danos cromossômicos poderiam resultar em distintos processos patológicos e carcinogênese (CATALINA, 2007). A expansão e cultura, em longo prazo, tornam-se imprescindíveis ao controle da qualidade das células e da genotoxicidade e mutagenicidade, a fim de avaliar a estabilidade genética de CTM, cultivadas *in vitro*, para conferir segurança aos procedimentos de terapia celular (LAMBERT et al., 2011).

DESENVOLVIMENTO

Este trabalho trata de uma revisão de literatura, de natureza descritiva e abordagem qualitativa, sobre estabilidade genética das CTM em cultivo prolongado e a importância dos métodos citogenéticos na segurança dos procedimentos de terapia celular. Foi realizada uma busca nas bases de dados on-line do Google Scholar, PubMed e SciELO, por meio das expressões “análise citogenética”, “células-tronco mesenquimais” e “aberrações cromossômicas”. Para a seleção das publicações, utilizou-se, como critérios de inclusão, as pesquisas científicas completas, gratuitas e com conexão direta ao tema.

As CTM foram primeiramente isoladas da medula óssea, que se encontram localizadas no compartimento basal medular, sendo responsáveis pela hematopoiese e pela diferenciação em linhagens mesenquimais (BIANCO et al., 2008). A presença de CT não hematopoiéticas, na medula óssea, foi primeiramente sugerida pelo patologista alemão Julius Clonheim, em 1867. Desde que essas células foram identificadas em trabalhos realizados por Friedenstein e outros (1970), despertaram enorme interesse em pesquisa, especialmente pelo seu potencial para uso em terapia celular. Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F) (TORRES, 2009).

Segundo Giordano e outros (2007) e Kingham (2007), as CTM possuem propriedades multipotentes de diferenciação, podendo originar células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal. Constituem um grupo de células clonogênicas, caracterizadas por possuírem potencial de diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica; pela capacidade de proliferação; pelo crescimento *in vitro* aderido ao plástico e com morfologia semelhante a fibroblastos (BYDLOWSKI et al., 2009). A capacidade imunomodulatória das CTM é outra característica que vem sendo cada vez mais estudada pelos pesquisadores, mostrando que podem modular o sistema imune através de atividades importantes para a manutenção de tolerância periférica, transplantes, autoimunidade, evasão tumoral e tolerância materno-fetal (NAUTA e FIBBE, 2007). Ademais, possuem habilidade quimiotática e migração para áreas de lesão ou inflamação (AGGARWAL e PITTENGER, 2005).

As CTM podem ser isoladas a partir de distintos tecidos, como polpa dentária humana imatura, tecido adiposo, periosteio, osso trabecular, músculo esquelético, membrana sinovial, sangue, pele ou fluido sinovial; mas a fonte primária de isolamento, em adultos, é a medula óssea (BYDLOWSKI et al., 2009). Estão associadas à presença de marcadores específicos de superfície que incluem CD44, CD29, CD90, CD105 e CD73, característicos de células mesenquimais, e a ausência de CD14, CD45 e CD34 presentes em linhagens hematopoiéticas (LI et al., 2011).

O uso terapêutico de CTM requer programas de controle de qualidade, segurança e rastreabilidade. Um dos principais problemas, em linhagens derivadas de CT, é a possibilidade do surgimento de alterações cromossômicas, que podem explicar, em parte, seu potencial tumorigênico *in vivo* (CATALINA et al., 2008; FOUDAH et al., 2009). As alterações cromossômicas são importantes, quando ocorrem de forma clonal, ou seja, quando aparecem em mais de uma célula analisada. Tais alterações clonais podem ser numéricas e estruturais. Ambas causam distúrbios no desenvolvimento celular, o que levam a apoptose ou distúrbios proliferativos (FANTINATTI et al., 2011).

As alterações cromossômicas numéricas incluem aneuploidia e euploidia. As aneuploidias podem ser classificadas de acordo com a quantidade de cromossomos presentes: monossomia (1 cromossomo presente), trissomia (3 presentes), tetrassomia (4 presentes) e nulissomia (ausência do par de cromossomos) (SARDINHA, 2015). As alterações cromossômicas estruturais incluem deleção, duplicação, formação de anel, translocação e inversão (DUESBERG et al., 2005; PAYÃO, 2009).

Alterações genéticas, desde uma mutação de ponto, até monossomias e trissomias cromossômicas, podem ser adquiridas durante a expansão de célula-tronco in vitro (BEN-DAVID et al., 2012). De acordo com Ferreira (2014), os trabalhos publicados, tanto descrevendo a ocorrência de alterações em CTM cultivadas, quanto à manutenção da normalidade, são consensuais quanto à necessidade de se atestar a segurança destas células para o uso clínico. No entanto, não há consenso quanto aos métodos e aos parâmetros mais adequados para se alcançar tal objetivo. Os relatos contraditórios sobre o cultivo e aplicação terapêutica de CTM demonstram urgência no desenvolvimento de algoritmos de controle de qualidade para o desenvolvimento das pesquisas pré-clínicas, para sua futura transferência e para as fases clínicas de estudo.

Dentre os testes citogenéticos mais comumente utilizados, encontra-se a análise em bandamento G, considerado padrão-ouro na citogenética convencional, sendo utilizado para detectar possíveis alterações numéricas e/ou estruturais nos cromossomos obtidos das diferentes passagens de culturas de CTM. Esse método tem como objetivo tornar visível as bandas de cada cromossomo, permitindo, assim, identificá-los e avaliar possíveis alterações (PAYÃO et al., 2009). Além disso, a cariotipagem por bandamento G permite a análise de todo genoma em um único experimento.

A técnica “Ensaio do Cometa” (EC) se destaca como uma técnica padrão para avaliar os danos e a reparação no DNA, devido a sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos desses danos (FAUST et al., 2004; TICE et al., 2000). O EC consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células, proporcionando a migração dos fragmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentarem núcleo intacto com membrana bem delimitada são consideradas sem danos; já as células identificadas visualmente com “cauda”, formadas pelos fragmentos de DNA, são consideradas células com danos detectáveis e classificadas quanto ao tamanho da cauda (BETTI; LOPRIENO; BARALE, 1994).

A instabilidade cromossômica, caracterizada como anormalidade genética, pode ser ainda demonstrada pela análise de micronúcleo (MCN) (DUESBERG et al., 1998), estruturas formadas por fragmentos cromossômicos e/ou cromossomos inteiros, não incluídos nos núcleos filhos, durante a divisão celular, resultando na formação micronúcleos (HOLLAND et al., 2008; MEIRELES, CERQUEIRA, 2011). Considera-se o teste de MCN como um biomarcador ocupacional em células expostas a agentes químicos genotóxicos, além de possível indicador de sinais carcinogênicos precoces. A frequência de MCN, nas células, aumenta em tecidos expostos aos carcinogêneos, antes que qualquer sintoma clínico se manifeste (SINGARAJU et al., 2012).

Diversas pesquisas foram realizadas em humanos, como análise da estabilidade genética de células-tronco mesenquimais humanas (CORNELIO, 2012); avaliação da integridade genômica em células-tronco cultivadas (BORGONOVO, 2016); análise da integridade genômica em células-tronco mesenquimais, derivadas do tecido adiposo (MALAGUTTI FERREIRA, 2016). Estes estudos demonstram a extrema importância do monitoramento de CTM, cultivadas in vitro, por meio de testes citogenéticos,

garantido a rastreabilidade, segurança e confiabilidade no uso terapêutico dessas células.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células-tronco mesenquimais, cultivadas por período prolongado in vitro, podem acumular alterações cromossômicas e ter sua taxa de mitose reduzida, gerando assim uma instabilidade genética, o que pode explicar o seu potencial tumorigênico. Ainda não há consenso quanto às técnicas e aos parâmetros mais adequados para atestar a segurança dessas células. Assim, impõem-se a necessidade de estudos adicionais e novas abordagens metodológicas, como análises mediante técnicas moleculares. Busca-se avaliar, com maior consistência e segurança, o emprego de CTM em procedimentos de terapia celular in vivo

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, p.1815-1822, 2005.
- BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Significant acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells: response to Sensebé et al. **Cells Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 10-11, 2012.
- BETTI C.; LOPRIENO, T. D. L. G.; BARALE R. Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutat. Res.** v. 307, p. 323-333, 1994.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell, Cambridge**, v. 2, n. 4, p.313-319, 2008.
- BORGONOVO, T. **Avaliação da integridade genômica de células-tronco cultivadas**. Tese – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016.
- BYDŁOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. bras. Hematologia. e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.
- CATALINA, P. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: A concise review. **Cell Biology International**. v. 31, n. 9, p. 861-869, 2007.
- CATALINA, P. et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? **Molecular Cancer**, v. 7, p. 76, 2008.
- CHEUNG, T. H.; RANDO, T. A. Regulação molecular de quiescência de células estaminais. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.14, p. 329 - 340, 2013.
- CORNÉLIO, D. A. **Análise da estabilidade genética de células-tronco mesenquimais humanas**. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potencial Clinical Uses. **Experimental Hematology**, v.28, p.875-884, 2000.
- DUESBERG, P.; LI, R.; FABARIUS, A.; HEHLMANN, R. The chromosomal basis of cancer. **Cell Oncol**, v.27, p.293-318, 2005.
- FANTINATTI, B.E.A.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; MELLO, D.C.; MARTINS, C. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**. v. 139, p. 1273-1282, 2011.

- FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R.H. Mann M. MerschSundermann V The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutat Res.** v.566, p.209-29, 2004.
- FERREIRA, R. J. **Avaliação de diferentes métodos de detecção de alterações celulares para triagem de células-tronco mesenquimais – estudo pré-clínico.** Tese - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- FOUDAH, D. et al. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Chromosome Res.** v.17, p.1025 – 1039, 2009.
- FRIEDENSTEIN A. J., CHAILAKHJAN R.K., LALYKINA K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.** v.1970, n.3, p.393-403, 1970.
- GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: na update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, n.1, p.27–35, 2007.
- HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mut Res.** v. 659, p. 93-108, 2008.
- KINGHAM, P. J. et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v.207, n.2, p.267–274, 2007.
- LAMBERT, A. P. F. et al. The role of damage and repair proteins in adipose-derived adult stem cell differentiation in neural-like cells. **J Tissue Sci Eng.** v. 2, p. 4, 2011.
- LI, Z. et al. Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. **PLoS one**, v. 6, p. 1-8, 2011.
- MALAGUTTI-FERREIRA, Maria José. **Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.** Dissertação – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.
- MEIRELES, J. R. C.; CERQUEIRA, E. M. M. Use of the micronucleus test on tradescantia (Trad-MCN) to evaluate the genotoxic effects of air pollution, **Air Pollution.** v.1, p.245–262, 2011.
- MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. **Cienc Rural**, v.40, n.1, p.238-45, 2010.
- MINGUELL, J.J; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.6, p.507-520, 2001.
- NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood.** v.110, p.3499-3506, 2007.
- PAYÃO, SEGATO, R.; SANTOS, R.R. Genetic control of cultivated human stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.31, n.1, p.15-18, 2009.
- TORRES, F.C. **Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco.** Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ROCHA, A.S.; MAIA, L.; UASTALI, M.D.; VOLPATO, R.; ALVARENGA, F.C.L. Considerações sobre células-tronco embrionárias. **Vet. Zootec.** v. 19, n. 3, p. 303-13, 2012.
- SARDINHA, V. **Aberrações cromossômicas: numéricas.** 2015. Disponível em: <https://www.biologianet.com/genetica/aberracoes-cromossomicas-numericas.htm> Acesso em: 25 jun. 2019.
- SINGARAJU, M.; SINGARAJU, S.; PARWANI, R.; WANJARI, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: A micronucleus study. **J Cytol.** v. 29, n. 1, p. 1-5, 2012.
- TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for In vitro and In vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis.** v. 35, p. 206 - 221, 2000.