

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: REVISÃO DE LITERATURA

**Luisa Demoner Vicentini, Márcio Phillip Andrade Correia, Thais Gonçalves
Tavares, Emerson Alex Oliveira Souza, Leonardo Oliveira Trivilin, Jankerle
Neves Boeloni.**

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES,
Brasil, luisademoner@hotmail.com, phillipandrdec@outlook.com, thastavares@yahoo.com.br,
emersonsouza.medvet@gmail.com, leotrivilin@gmail.com, jankerle@gmail.com.

Resumo

Cada vez mais busca-se por terapias alternativas que possam facilitar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes e nesse contexto, as células-tronco mesenquimais (CTM) vêm sendo amplamente estudadas devido sua habilidade de cicatrização, autorenovação e diferenciação. Muito se sabe sobre o mecanismo o qual essas células se diferenciam na linhagem osteogênica, no entanto são necessários mais estudos para saber como de fato ele ocorre e como é a expressão gênica durante esse processo. Assim, o objetivo dessa revisão foi apresentar um estudo sobre a expressão gênica que ocorre durante a diferenciação osteogênica de CTM. Dessa maneira, foi realizado um levantamento de artigos publicados entre 2019 e 2022, utilizando critérios de relevância e priorizando estudos que abordavam o tema de forma ampla e clara, sendo selecionados 17 de 63 trabalhos. Portanto, foi possível concluir que a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais apresenta papel promissor no tratamento de afecções ósseas e que entender a expressão gênica que ocorre no processo é de suma importância, sendo esta um mecanismo complexo de alterações moleculares e assim, faz-se necessário mais estudos que elucidem.

Palavras-chave: Células-tronco. Diferenciação osteogênica. Expressão gênica.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

As células-tronco mesenquimais podem ser encontradas em quantidades e tecidos variáveis, sendo classificadas como adultas e multipotentes, com capacidade de se autorenovarem e adquirir fenótipo de diversos tipos celulares, além de serem plástico aderentes, o que permite sua ampla utilização em estudos *in vitro* (SPILA, 2019). Essa capacidade de adesão deve-se ao fato dessas células apresentarem forma semelhante aos fibroblastos, emitindo prolongamentos e secretando matriz extracelular. Ademais, quando estimuladas essas células são capazes de se diferenciar em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica (SILVA, 2019).

Não obstante, dentre os tecidos que podem ser diferenciados pode ser citado o ósseo, em que o processo de diferenciação osteogênica vai desde a célula-tronco indiferenciada, até um progenitor que irá dar origem ao tipo celular específico esperando. Assim, para que o potencial clínico dessas células seja alcançado, é de suma importância o entendimento dos mecanismos de diferenciação, como por exemplo compreender como ocorre a regulação dos genes durante o processo (MARCON, 2019). Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi apresentar uma revisão de literatura sobre a expressão gênica que ocorre durante o processo de diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais.

Metodologia

Esse estudo baseou-se na coleta de informações acadêmicas sobre o assunto, a partir de revisão bibliográfica criteriosa. Realizou-se buscas de material bibliográfico publicado entre 2019 e 2022, nos idiomas português e inglês, por meio dos descritores "*Stem cells*", "*Mesenchymal stem cells*",

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

“*Osteogenic differentiation*”, “*Osteogenesis*” e “*Gene expression*”, combinados ou não, trazendo como critério de inclusão a indexação das plataformas de dados científicos Google Scholar, Pubmed e Scielo.

Resultados

O levantamento bibliográfico resultou em 63 artigos, que foram submetidos a leitura e estudo. Dentre eles, foram selecionados 17 trabalhos, que abordaram o tema de forma clara e ampla. Foi também utilizado como critério, priorizar trabalhos que traziam informações relevantes e ainda que abordavam tópicos essenciais, como os demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Trabalhos utilizados no presente estudo e principais assuntos abordados.

Assunto principal	Trabalhos utilizados
Células-tronco mesenquimais	LAN <i>et al.</i> , 2021 LU <i>et al.</i> , 2022 RAMAN <i>et al.</i> , 2022 SUROWIECKA <i>et al.</i> , 2022
Diferenciação osteogênica	ARAÚJO, 2022 LU <i>et al.</i> , 2022 RAMESH, 2021 SHARIFI <i>et al.</i> , 2020 SILVA, 2019 SMITH e ELISEEV, 2021 YANG <i>et al.</i> , 2021
Expressão gênica durante a diferenciação osteogênica	GAVAZZO <i>et al.</i> , 2021 KUTERBEKOV <i>et al.</i> , 2020 OLIVEIRA, 2019 RAMESH, 2021 SPILA, 2019 SHAF AEI e KALARESTAGHI, 2020 SHARIFI <i>et al.</i> , 2020 WAGLEY <i>et al.</i> , 2020

Fonte: confeccionado pelos autores.

Discussão

De acordo com Lan *et al.* (2021), as células-tronco mesenquimais foram estudadas pela primeira vez em 1976, sendo essas células distribuídas em grande quantidade no corpo dos seres humanos. Ademais, elas podem ser classificadas como multipotentes, apresentando capacidade de se diferenciar em certos tipos de células, sendo capazes de reparar tecidos onde se encontram além de se diferenciarem em células maduras, como adipócitos, osteoblastos, condroblastos (RAMAN *et al.*, 2022; SUROWIECKA *et al.*, 2022), tenócitos, cardiomiócitos, queratinócitos, hepatócitos e células neurais (RAMAN *et al.*, 2022). E assim, essas características fazem com que essas células sejam opção terapêutica promissora no tratamento de algumas afecções (LU *et al.*, 2022; SUROWIECKA *et al.*, 2022).

A diferenciação osteogênica é o processo pelo qual as células-tronco mesenquimais formam os osteoblastos, sendo muito importante para a formação do tecido ósseo durante o desenvolvimento, reparo de fraturas e manutenção do tecido (SMITH e ELISEEV, 2021). O mecanismo de como ocorre essa diferenciação *in vivo* e *in vitro* vêm sendo estudado e sabe-se que esses abrangem sinais que vem tanto internamente às células quanto externamente, podendo ser exemplificada por genes, citocinas, estímulos físicos e o microambiente (SILVA, 2019). Dessa forma, quando fala-se sobre a diferenciação osteogênica *in vitro*, para promover essa diferenciação suplementos diversos precisam ser acrescidos do meio de cultivo para que se tenha um suporte desse processo. Neste sentido, em vários estudos realizados, como Araújo (2022); Ramesh (2020); Sharifi *et al.* (2020); Yang *et al.* (2021), em sua metodologia usaram DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) acrescido de 10% de soro fetal bovino, β-glicerofosfato (10 mM), dexametasona (0,1 μM) e ácido ascórbico (50 μg/mL).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Ademais, durante o processo de diferenciação, a cromatina celular é remodelada e permite a ativação ou reprime genes reguladores, ou seja, genes específicos da linhagem em diferenciação são ativados em resposta à estímulos (LU *et al.*, 2022). Nesse cenário, a diferenciação se inicia pela formação das células osteoprogenitoras, que posteriormente serão pré-osteoblastos, osteoblastos maduros e por fim, osteócitos (SPILA, 2019). Desse modo, entender o que ocorre durante esse processo é importante para que essas células possam ser usadas na clínica de afecções ósseas (YANG *et al.*, 2021) e assim, sobre as alterações moleculares, muitos genes são descritos como reguladores osteogênicos, visto que é um processo complexo (RAMESH, 2021). O processo se inicia por meio da ativação das vias de sinalização osteogênica, que são desencadeadas pela ligação de fatores com os receptores das células, sendo seguido por etapas de regulação positiva de genes osteogênicos (KUTERBEKOV *et al.*, 2020).

Dessa forma, entre os genes marcadores podem ser citados o *Osx* e o *Runx2*, que são elementos fundamentais e que aumentam a diferenciação osteoblástica (SHARIFI *et al.*, 2020). O *Osx* é um fator de transcrição de dedo de zinco (GAVAZZO *et al.*, 2021), sendo exclusivo de osteoblastos e envolvido na formação de tecido ósseo, e o *Runx2* apresenta expressão alta a nível inicial de diferenciação, estimulando genes adicionais, dentre os quais podemos citar o colágeno tipo 1 e a osteocalcina (RAMESH, 2021). Pode-se dizer ainda, que o *Runx2* está intimamente ligado com a regulação do *Osx*, que irá fazer a regulação da diferenciação de osteoblastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SHARIFI *et al.*, 2020). Outrossim, além de atuar aumentando a expressão de outros marcadores osteogênicos, o *Runx2* atua de forma a diminuir a expressão de marcadores que promovem a diferenciação adipogênica, como por exemplo o *PPAR γ* (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) e lipoproteína lipase (OLIVEIRA, 2019).

A osteocalcina (OCN) também se encaixa como um marcador, sendo sua expressão mais marcante na fase mais tardia e de grande importância no processo de mineralização, estando presente também no osteoblasto maduro. Assim também, o colágeno tipo 1 está associado com a matriz extracelular, promovendo a ligação entre proteínas a receptores da membrana (RAMESH, 2021). Tem-se ainda a fosfatase alcalina (ALP), que é um marcador inicial de diferenciação, apresentando papel importante, onde sua expressão de mRNA (RNA mensageiro) está diretamente relacionado com a síntese de colágeno tipo 1 e a formação da matriz óssea (RAMESH, 2021). Cabe ressaltar que a fosfatase alcalina não é específica do tecido ósseo apesar de estar altamente expressa, mas o envelhecimento ósseo, assim como a determinação do tipo celular durante a diferenciação osteogênica ocorre com regulação da liberação e hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) que é feita pela fosfatase (OLIVEIRA, 2019).

Os osteoblastos imaturos expressam o gene *SPP1* (*Secreted Phosphoprotein 1*), que é responsável por codificar uma glicoproteína conhecida como osteopontina (OPN). A formação dessa proteína ocorre via calcitrol, que está relacionado como a reabsorção óssea e ela está envolvida em processos, dentre os quais podemos citar a calcificação e biomineralização. Pode-se ressaltar ainda, que a OPN é expressa não só no tecido ósseo, mas também em rim, cartilagem, útero, glândulas mamárias, entre outros (OLIVEIRA, 2019).

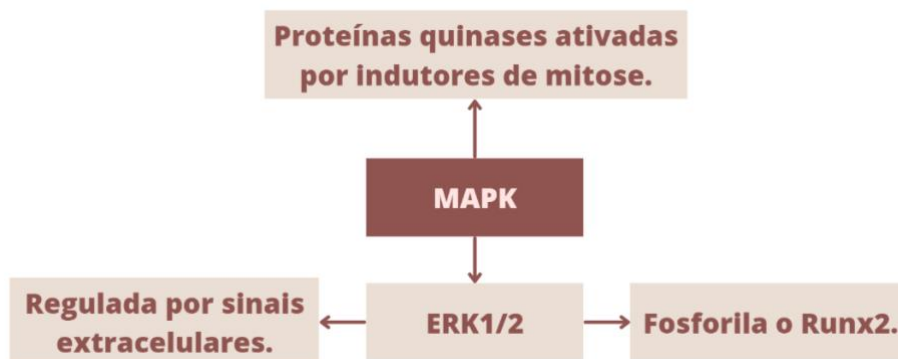
Os fatores de transcrição são regulados por sinalização, onde uma das vias conhecidas é a MAPK (proteínas quinases ativadas por indutores de mitose) que se encontra exemplificada na Figura 1. Essa via pode ser subdividida em quinases reguladas por sinais extracelular (ERK, *JNK* (*c-Jun N-terminal kinase*) e, por fim, a *p38 MAPK* (*p38 mitogen-activated protein kinases*) (KUTERBEKOV *et al.*, 2020). Uma dessas proteínas é a *ERK1/2* (*Extracellular signal-regulated protein kinase*), que é conhecida por regular a chave de crescimento e proliferação, apresentando papel crucial na fosforilação dos fatores de transcrição que irão expressar o fenótipo nas CTM. Como exemplo disso, durante a diferenciação há um aumento da atividade da *ERK1/2*, que fosforila o *RUNX2* (GAVAZZO *et al.*, 2021).

Outra via de sinalização que pode ser citada é a das glicoproteínas *Wnts*, que encontra-se representada na Figura 2, sendo que as mesmas são produzidas por mamíferos, além de estarem envolvidas no desenvolvimento embrionário, indução tecidual, determinação celular e proliferação e diferenciação de células-tronco. As *Wnts* incluem pelo menos 19 proteínas, e podem ser divididas nas vias dependentes de catenina (canônicas) e nas não dependentes (não canônicas), sendo a via dependente (β -canônica) a que estimula a osteogênese e previne a condrogênese e adipogênese. Essa via atua a partir da diferenciação de osteoblastos pela ativação da transição do *Runx2* para *Osx* (SHAF AEI e KALARESTAGHI, 2020).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

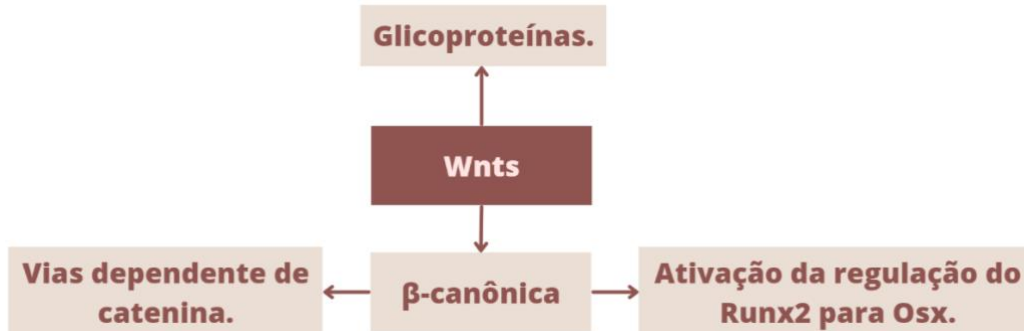
Outros fatores osteoindutores que estão envolvidos nas diferentes vias de sinalização são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que estão representadas na Figura 3, sendo que elas atuam por vias dependentes e independentes de Smad, onde na dependente há a fosforilação, formando um complexo e translocando para o núcleo para que ocorra a indução da expressão dos genes como Runx2 e Osx. Enquanto na independente, as cascatas MAPK são estimuladas para osteoindução (SHAF AEI e KALARESTAGHI, 2020). Existem 16 subtipos de BMPs, onde os subtipos 2, 4, 6, 7 e 9 são considerados os mais osteoindutores (KUTERBEKOV *et al.*, 2020; SHAF AEI e KALARESTAGHI, 2020; WAGLEY *et al.*, 2020).

Figura 1 – Esquema representativo da via MAPK.



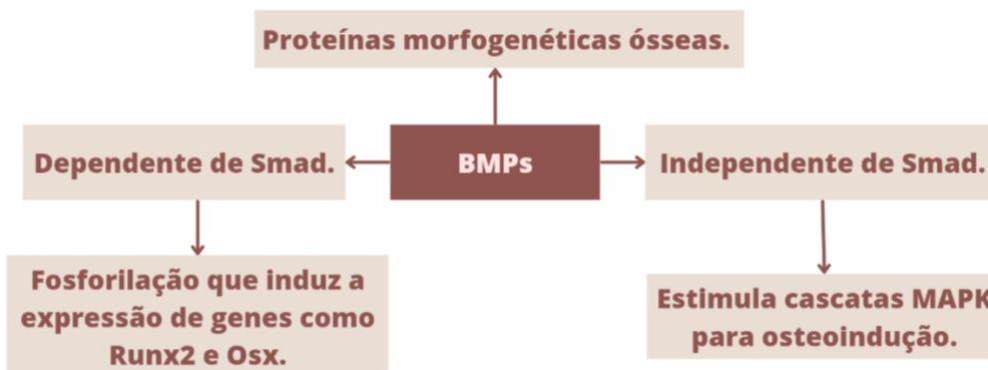
Fonte: confeccionado pelos autores.

Figura 2 – Esquema representativo da via das glicoproteínas Wnts.



Fonte: confeccionado pelos autores.

Figura 3 – Esquema representativo da via das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).



Fonte: confeccionado pelos autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

A partir do levantamento de dados do presente estudo, fica evidente que é muito importante conhecer o mecanismo pelo qual ocorre a diferenciação das células-tronco mesenquimais em células da linhagem osteogênica, visto o destaque que essas células recebem na terapêutica de várias afecções, como as enfermidades ósseas, somado ao fato da facilidade do estudo *in vitro* que elas fornecem. Destaca-se também a complexidade da expressão gênica que ocorre na diferenciação osteogênica, sendo necessários mais estudos que elucidem esse processo amplo e dinâmico.

Referências

- ARAÚJO, F. R. **Efeitos do hipertireoidismo materno pré e pós-natal sobre o crescimento endocondral e intramembranoso da prole de ratos: estudos *in vitro* com condrócitos e osteoblastos.** 2022. 140f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.
- GVAZZO, P. *et al.* Biophysical phenotyping of mesenchymal stem cells along the osteogenic differentiation pathway. **Cell Biology and Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 915-933, 2021. DOI: 10.1007/s10565-020-09569-7
- KUTERBEKOV, M. *et al.* Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells: from bench to clinics. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 26, n. 5, p. 461-474, 2020. DOI: 10.1089/ten.TEB.2019.0225
- LAN, T. *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2021. DOI: 10.1186/s13045-021-01208-w
- LU, W. *et al.* Regulatory mechanisms of GCN5 in osteogenic differentiation of MSCs in periodontitis. **Clinical and Experimental Dental Research**, v.3, n.9, p.464-471, 2022. DOI: 10.1002/cre2.695
- MARCON, B. H. **Análise da regulação da expressão gênica em células-tronco obtidas de tecido adiposo humano durante a diferenciação adipogênica e osteogênica e estudo do papel da helicase DDX6 neste processo.** 2019. 178f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia). Instituto Carlos Chagas, Curitiba, 2019.
- OLIVEIRA, B. A. **Ação dos oxisteróis na diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.** 2019. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2019.
- RAMAN, N. *et al.* Mechanotransduction in mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4580, 2022. DOI: 10.3390/ijms23094580
- RAMESH, T. Osteogenic differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced by bacoside-A. **Cell Biochemistry and Function**, v. 39, n. 1, p. 148-158, 2020. DOI: 10.1002/cbf.3596
- SHAF AEI, H.; KALARESTAGHI, H. Adipose-derived stem cells: An appropriate selection for osteogenic differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 11, p. 8371-8386, 2020. DOI: 10.1002/jcp.29681
- SHARIFI, S. *et al.* Phytochemicals impact on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **BioFactors**, v. 46, n. 6, p. 874-893, 2020. DOI: 10.1002/biof.1682

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

SILVA, C. L. R. **Efeito *in vitro* da cafeína e etanol isolados ou em associação sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas.** 2019. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SMITH, C. O.; ELISEEV, R. A. Energy metabolism during osteogenic differentiation: the role of Akt. **Stem cells and development**, v. 30, n. 3, p. 149-162, 2021. DOI: 10.1089/scd.2020.0141

SPILA, D. O. **Efeito *in vitro* da Triiodotironina (T3) na Diferenciação Osteogênica e Condrogênica das Células-Tronco do Tecido Adiposo de Equinos.** 2019. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SUROWIECKA, A. *et al.* Mesenchymal stem cells in burn wound management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 15339, 2022. DOI: 10.3390/ijms232315339

WAGLEY, Y. *et al.* Canonical Notch signaling is required for bone morphogenetic protein-mediated human osteoblast differentiation. **Stem Cells**, v. 38, n. 10, p. 1332-1347, 2020. DOI: 10.1002/stem.3245

YANG, L. *et al.* Wnt7a promotes the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 6, p. 1-10, 2021. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4927

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), do Laboratório Multiusuário de Experimentação e o Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UFES.