



Análise de transcritos relacionados com inflamação e reparo tecidual em pericitos e células mesenquimais multipotentes

Amanda Dalla'cort Chaves¹
Lindolfo da Silva Meirelles²
(lindolfo.meirelles@ulbra.br,
^{1, 2}Universidade Luterana do Brasil)

Introdução

Macrófagos e neutrófilos são células do sistema imune inato que desempenham diversas funções relacionadas a defesa contra infecções e remoção de resíduos celulares. Macrófagos também desempenham um papel muito importante ao longo do reparo tecidual, quando adquirem características que determinam a resolução de lesões. Dentre as demais células que participam do reparo tecidual encontram-se células estromais mesenquimais (CMMs) que se desenvolvem a partir da proliferação de células perivasculares (pericitos) durante lesão, e que podem ser propagadas em cultura. As CMMs secretam diversas moléculas que contribuem para o reparo tecidual. Algumas dessas moléculas exercem efeitos supressores sobre células do sistema imune adaptativo, enquanto outras favorecem a aquisição de um fenótipo pró-regenerativo por macrófagos. Recentemente, demonstrou-se que macrófagos pró-inflamatórios (M1) que são ativados nos primeiros momentos de uma lesão tecidual determinam a ativação de células perivasculares, que passam a proliferar e produzir moléculas que contribuem para a resolução da lesão. Postula-se que, neste estado proliferativo, as CMMs derivadas de pericitos, que são semelhantes às CMMs expandidas em cultura denominadas células estromais mesenquimais (CEMs), passam a contribuir para a aquisição de um estado pró-regenerativo por macrófagos, que passam a exercer um papel chave para a resolução da lesão tecidual. As mudanças de expressão gênica em pericitos quando de sua transição fenotípica para CMMs/CEMs relacionadas a inflamação e reparo tecidual ainda não foram abordadas de modo sistemático.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi determinar mudanças na expressão de genes cujos produtos estão envolvidos com promoção ou inibição de inflamação e também de genes cujos produtos possam influenciar o processo de reparo tecidual em pericitos cultivados caracterizados como CMMs e seus precursores, pericitos recém isolados (não cultivados).

Metodologia

Dados de microarranjos de pericitos não cultivados (N=2) e de pericitos cultivados previamente caracterizados como CMMs (N=3) disponíveis no banco de dados de expressão gênica Gene Expression Omnibus (GEO) foram analisados com o auxílio do programa BRB-ArrayTools. Os dados de expressão gênica foram convertidos para log2 e agrupados de acordo com as suas características; spots marcados e spots com um tamanho menor que 10 foram removidos, e genes que continham mais de 50% de valores de expressão ausentes foram excluídos. Análises estatísticas foram realizadas com a ferramenta "comparação de classe entre grupos de arranjos" do BRB-ArrayTools com a configuração padrão, que inclui um nível de significância nominal de 0.001 para cada teste univariado. Após a exclusão de genes cuja expressão não tinha diferença estatisticamente significativa entre pericitos não cultivados e pericitos cultivados caracterizados como MMCs (da Silva Meirelles et al., 2015), foi gerada uma lista com os símbolos e nomes de cada gene, seus respectivos valores de expressão em cada uma das amostras realizadas, os valores de multiplicidade de expressão (fold-change) e também os valores de p e de taxas de detecção falsas (false detection rate, FDR). As células com valores de expressão gênica nas planilhas resultantes foram pseudocoloridas de modo a representar o nível de expressão de cada transcrito. Por fim, as listas resultantes foram submetidas a análises supervisionadas a fim de identificarem-se transcritos que, além de apresentarem diferença significativa de expressão entre pericitos não cultivados e pericitos cultivados, tivessem diferenças em multiplicidade de expressão maior que 5 vezes e estivessem relacionados com inflamação ou reparo tecidual.

Resultados

Observou-se que o nível de expressão de diversos genes codificantes de diversas citocinas pró-inflamatórias era significativamente maior em pericitos não cultivados do que em pericitos cultivados caracterizados como CMMs (Tabela 1). O gene codificante da quimiocina CXCL2 foi o que apresentou a maior diferença de multiplicidade de expressão, sendo 416 vezes mais expresso em pericitos não cultivados do que em pericitos cultivados caracterizados como CMMs. CXCL2, também conhecido como proteína inflamatória de macrófago 2-alfa, é quimioatraente para neutrófilos, células brancas recrutadas do sangue para os tecidos após dano tecidual. A expressão de transcritos codificantes para a quimiocina CXCL8 (também conhecida como interleucina 8) um importante quimioatraente para neutrófilos, foi 250 vezes mais expresso por pericitos não cultivados do que em pericitos cultivados caracterizados como MMCs. O gene que codifica a quimiocina CXCL3, que atrai monócitos para locais lesados, foi o terceiro com maior diferença de multiplicidade de expressão, sendo 222 vezes mais expresso em pericitos não cultivados. Outros genes codificantes de citocinas significativamente mais expressos em pericitos não cultivados foram *IL6*, *IL17D*, *CCL2*, *CCL26*, *CXCL9*, e *CXCL10*, sendo que os dois últimos praticamente não foram expressos por pericitos cultivados caracterizados como CMMs. Já entre os genes relacionados a inflamação ou reparo tecidual significante mais expressos em pericitos cultivados caracterizados como CMMs, encontrou-se *LTBP1*, que codifica a proteína ligante de fator de crescimento transformante beta latente. Nas células que a produzem, essa proteína encontra-se associada à forma inativa do fator de crescimento transformante beta (TGF-beta), e pode ser usada como uma medida indireta da produção desse fator. TGF-beta é uma das principais citocinas com ação imunossupressora em linfócitos T e também está envolvida na conversão de monócitos e macrófagos M1 em macrófagos M2. *LTBP1* estava 31 vezes mais expresso em pericitos cultivados caracterizados como CMMs do que em pericitos não cultivados; nestes, detectou-se também a expressão de *TGFBI*, que codifica uma proteína induzida por TGF-beta. Isso levanta a possibilidade de que os pericitos cultivados caracterizados como CMMs, além de produzirem grandes quantidades de TGF-beta, também respondem a ele de modo autócrino.

Tabela 1 – Expressão de transcritos codificantes de moléculas relacionadas a inflamação e/ou reparo tecidual em pericitos não cultivados e pericitos cultivados caracterizados como células mesenquimais multipotentes

Sonda	Nome	Símbolo	PC 1	PC 2	PC (média)	PC/CMM 1	PC/CMM 2	PC/CMM 3	PC/CMM (média)	Fold-change	Valor de p paramétrico	FDR
A_23_P71037	Homo sapiens interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6)	IL6	17.749	17.674	17.712	12.149	13.606	14.183	13.313	21.28	0.0004523	0.0093
A_23_P345692	Homo sapiens interleukin 17D (IL17D)	IL17D	11.878	11.288	11.583	7.443	7.334	6.157	6.978	24.39	0.000111	0.00483
A_23_P89431	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	CCL2	16.871	17.199	17.035	13.857	13.214	12.977	13.349	12.82	0.0001074	0.0048
A_23_P215484	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 26 (CCL26)	CCL26	8.997	9.176	9.087	5.881	5.763	6.263	5.969	8.33	0.0001213	0.005
A_24_P257416	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	CXCL2	17.239	18.199	17.719	10.373	8.254	8.389	9.005	416.67	2.25E-05	0.00227
A_23_P315364	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	CXCL2	18.057	18.298	18.178	10.821	12.099	12.826	11.915	76.92	5.60E-05	0.00357
A_24_P183150	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)	CXCL3	14.985	16.804	15.895	8.271	7.509	8.475	8.085	222.22	1.69E-05	0.002
A_32_P87013	Homo sapiens interleukin 8 (IL8)	CXCL8	14.650	15.554	15.102	7.193	6.507	7.740	7.147	250.00	4.50E-06	0.00125
A_23_P18452	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)	CXCL9	10.822	9.970	10.396	4.727	3.892	2.572	3.730	101.01	6.94E-05	0.00387
A_24_P303091	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	CXCL10	8.499	7.530	8.015	2.206	1.845	1.913	1.988	66.67	7.30E-06	0.00154
A_23_P156327	Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFBI)	TGFBI	13.846	14.705	14.276	18.351	18.351	18.626	18.443	17.97	4.74E-05	0.00332
A_23_P43810	Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1)	LTBP1	8.154	7.163	7.659	12.018	12.831	12.982	12.610	30.95	5.74E-05	0.0036

PC, pericito não cultivado; PC/CMM, pericito não cultivado caracterizado como célula mesenquimal multipotente; fold-change, multiplicidade de expressão; FDR, false detection rate, taxa de detecção falsa

Conclusão

Esses resultados são consistentes com uma ação pró-inflamatória de pericitos logo após um evento de dano tecidual, seguida de uma conversão fenotípica desses pericitos para CMMs com consequente redução de produção de moléculas pró-inflamatórias e aumento na produção de TGF-beta, que além de reduzir a inflamação ainda contribui para a formação de macrófagos M2 a partir de monócitos e macrófagos M1 (da Silva Meirelles et al., 2020).

Referências

da Silva Meirelles L, Malta TM, de Deus Wagatsuma VM, Palma PV, Araújo AG, Ribeiro Malmegrim KC, Morato de Oliveira F, Panepucci RA, Silva WA Jr, Kashima Haddad S, Covas DT. Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile. *Stem Cells Dev.* 2015 Dec 1;24(23):2822-40.

da Silva Meirelles L, Marson RF, Solari MIG, Nardi NB. Are Liver Pericytes Just Precursors of Myofibroblasts in Hepatic Diseases? Insights from the Crosstalk between Perivascular and Inflammatory Cells in Liver Injury and Repair. *Cells.* 2020 Jan 11;9(1):188.