



INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Lindolfo da Silva Meirelles

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

Resumo

Dentre as células-tronco cultivadas descritas até o momento, a célula-tronco mesenquimal (CTM) se destaca por sua grande plasticidade in vitro e seus efeitos tróficos, além de relativa facilidade de obtenção e cultivo. Diferentes linhas de evidência apontam o pericito, um tipo particular de célula perivasculare, como a célula que dá origem às células cultivadas denominadas CTMs. Em seu nicho nativo, pericitos são células que contribuem para a estabilização de vasos sanguíneos. Em situações de lesão tecidual, pericitos desconnectam-se das células endoteliais destes vasos e essa liberação permite a eles sofrerem uma série de mudanças fenotípicas denominadas coletivamente como ativação. Postula-se que pericitos ativados exercem um papel fundamental nos processos de reparo e regeneração tecidual através da secreção de moléculas tróficas, imunomodulatórias e pró-angiogênicas de maneira semelhante a CTMs cultivadas. Recentemente, demonstramos que pericitos podem assumir um fenótipo celular congruente com o de CTMs cultivadas. O caminho inverso – aquisição de características de pericito por CTMs cultivadas – tem sido pouco explorado. Sabe-se que CTMs cultivadas adicionadas a modelos de angiogênese in vitro posicionam-se próximo a estruturas rudimentares semelhantes a capilares sanguíneos, o que sugere que uma mudança fenotípica de CTM para pericito também pode ocorrer. No entanto, a aquisição de um fenótipo pericítico por CTMs cultivadas, ainda não foi demonstrada detalhadamente. Essa demonstração poderia validar a utilização de CTMs cultivadas na engenharia de tecidos pré-vascularizados. Neste estudo, testamos a hipótese de que o contato com células endoteliais pode induzir a aquisição de um fenótipo pericítico por CTMs cultivadas estabelecidas a partir de tecido adiposo humano. Dentre as células endoteliais utilizadas, incluíram-se a linhagem celular endotelial murina EOMA, células endoteliais de rato, e células endoteliais humanas. Três sistemas de cocultivo tridimensional – hidrogel peptídico, Matrigel®, e esferoides – foram testados para permitir a interação entre CTMs cultivadas e células endoteliais. A molécula CD271, um marcador altamente específico para pericitos in situ, foi utilizada para a detecção do fenótipo pericítico. A detecção da expressão dessa molécula foi realizada por citometria de fluxo e por PCR em tempo real (qPCR). O sistema de cocultivo baseado em hidrogel peptídico não foi consistente e foi abandonado. Já o sistema de cocultivo baseado em Matrigel®, no qual células endoteliais formam estruturas rudimentares semelhantes a vasos sanguíneos antes da adição das CTMs cultivadas, foi parcialmente satisfatório: um aumento na expressão do RNA que codifica CD271 foi observado nas CTMs cultivadas, mas células positivas CD271 não foram observáveis por microscopia de fluorescência. Já no modelo de cocultivo em esferoides, uma fração de células positivas para CD271 foi detectada por citometria de fluxo. Esse resultado indica que CTMs cultivadas podem readquirir um fenótipo pericítico quando condições adequadas para isso lhes são dadas. Experimentos adicionais estão em andamento para validação desse achado por outros métodos. Este estudo é financiado com recursos do CNPq e da FAPERGS.

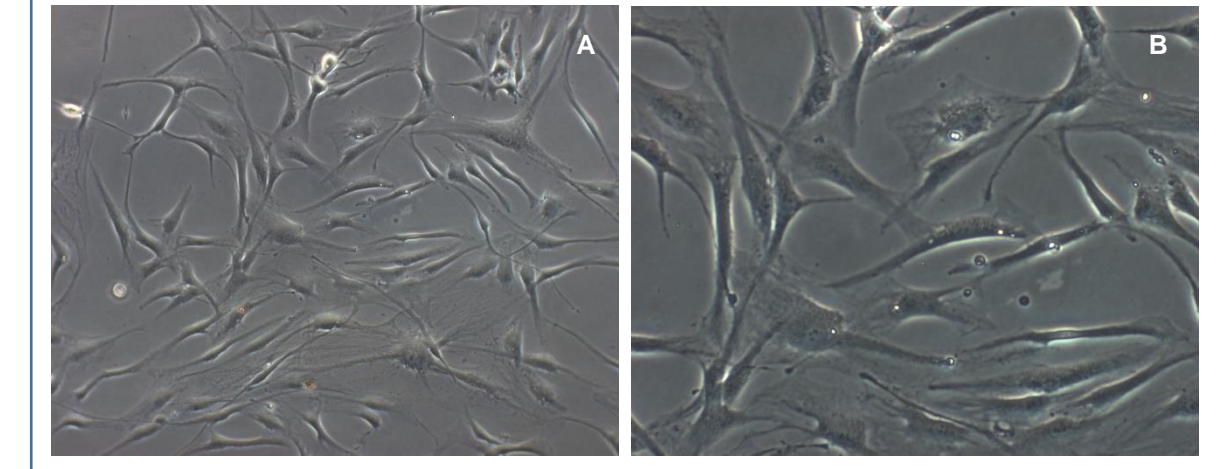
Introdução

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são células cultivadas que podem dar origem a tipos celulares mesenquimais maduros (por exemplo, adipócitos, osteócitos, condrocitos) quando mantidas em condições apropriadas. Além disso, CTMs secretam diversas moléculas que exercem efeitos tróficos e imunomodulatórios de modo parácrino. Diversas linhas de evidência indicam que as células que dão origem às CTMs cultivadas são os pericitos. Recentemente, demonstramos a origem pericítica de CTMs por meio de análise de microarranjos (da Silva Meirelles et al., Stem Cells Dev. 2015, doi:10.1089/scd.2015.0153). Pericitos (células azuis com núcleo lilás na figura ao lado) são células cujos processos celulares envolvem células endoteliais (representadas em verde na figura ao lado) em vasos sanguíneos (A), especialmente os de menor calibre (capilares, vênulas, arteríolas). Em determinadas situações, como durante lesão tecidual, pericitos perdem contato com células endoteliais e passam por um processo chamado ativação (B). Postula-se que, durante a lesão tecidual, esses pericitos ativados produzam diversas moléculas tróficas e imunomodulatórias (assim como CTMs cultivadas) que podem contribuir para a resolução da lesão.

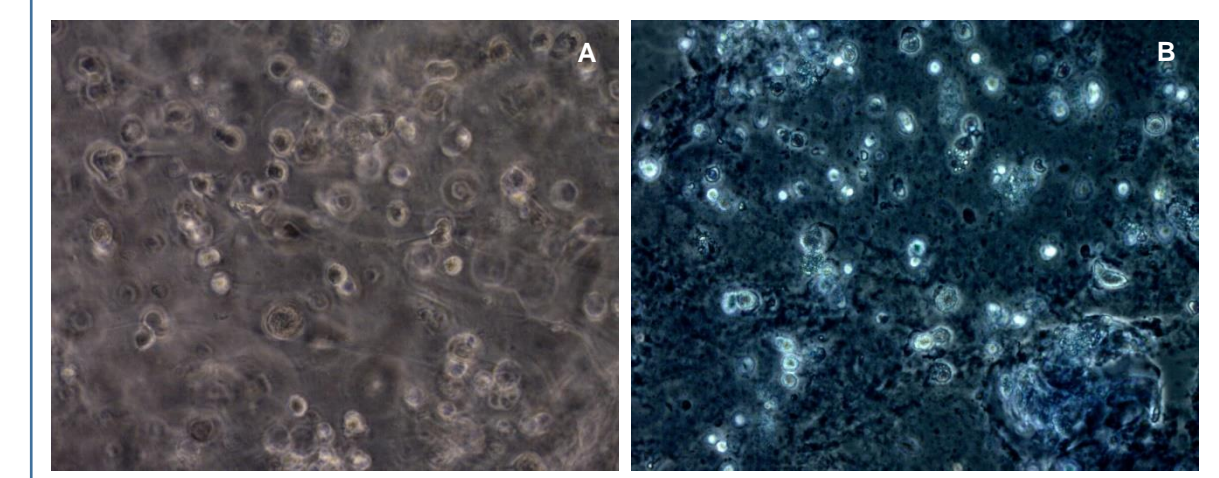
Durante o desenvolvimento, células endoteliais dos vasos sanguíneos que invadem os tecidos recrutam células mesenquimais adjacentes, que diferenciam em pericitos. Com isso em mente, perguntamo-nos se CTMs poderiam reassumir um fenótipo pericítico quando em contato com células endoteliais (C). A relevância desta questão está relacionada à possível aplicação de CTMs como uma fonte de pericitos na produção de rudimentos teciduais vascularizados, um dos objetivos da engenharia de tecidos. Para tentar responder a essa pergunta, CTMs de tecido adiposo humano foram cocultivadas com células endoteliais humanas, de rato, ou com a linhagem celular endotelial murina EOMA em diferentes condições, e verificamos se a molécula CD271, um marcador específico de pericitos, passa a ser expressa após esse cocultivo. Em alguns experimentos, também verificamos se as moléculas CD34 (expressa em células endoteliais e pericitos de tecido adiposo humano) e NG2 (marcador de pericitos ativados) passam a ser expressas por CTMs em contato com células endoteliais.

Resultados

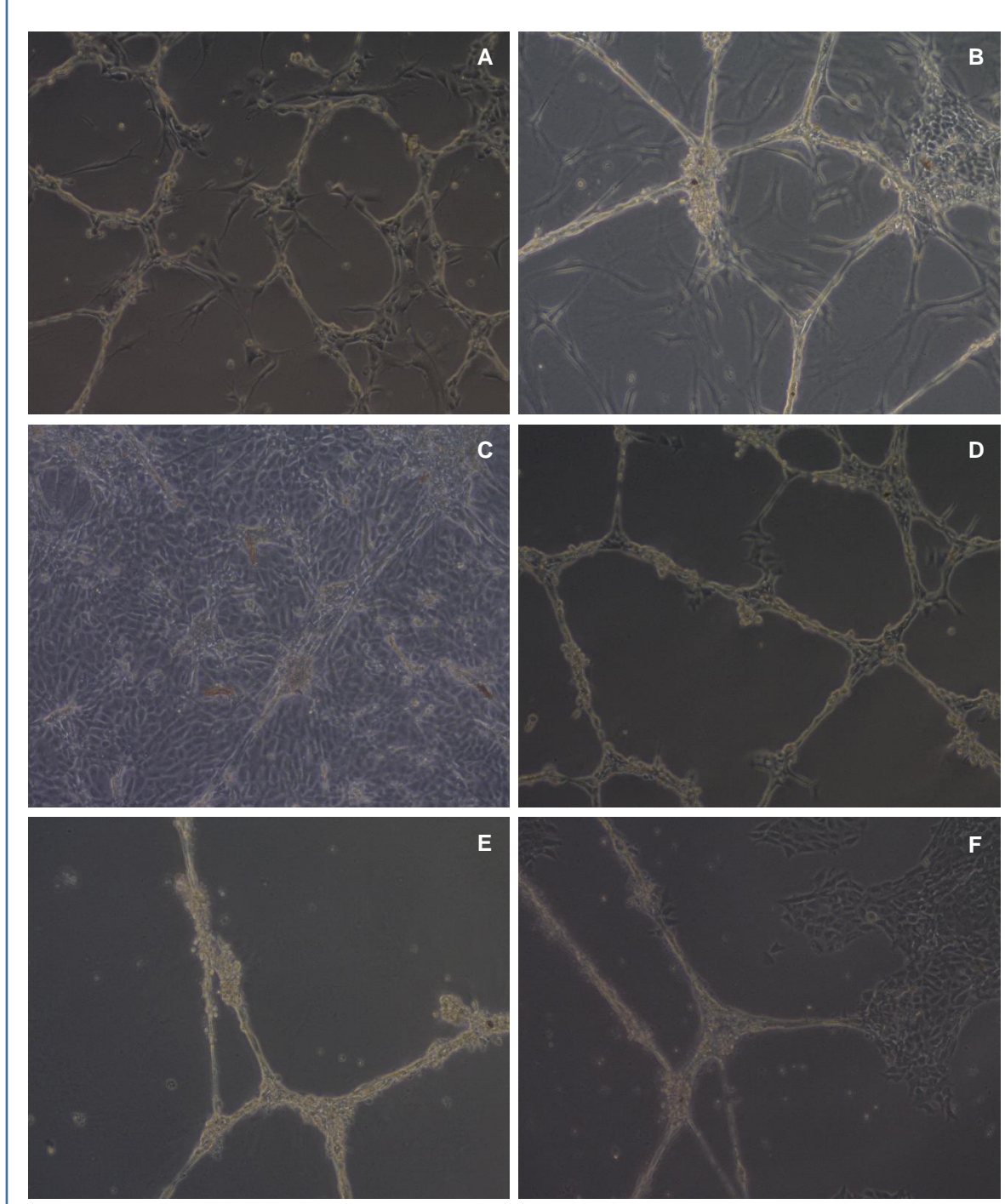
CTMs de tecido adiposo humano observadas com contraste de fase. Aumentos de 100x (A) e 200x (B).



CTMs de tecido adiposo humano encapsuladas em PuraMatrix®. (A) após 24h de cultivo e (B) após 13 dias de cultivo e coradas com Azul Tripán. Aumentos de 200x.



Cocultivo de CTMs-TA e rBMECs em Matrigel® por 7 dias. (A) cocultivo simultâneo de CTMs-TA e rBMECs após 24h, (B) após 3 dias e (C) após 7 dias. (D) rBMECs após 24h, (E) após 3 dias e (F) após 7 dias. Aumentos de 100x.



Análise da expressão dos genes NGFR, CSPG4 e CD34, através de PCR em tempo real, nos cocultivos de CTMs e EOMA e das células sozinhas, tanto em Matrigel® quanto em 2D. Os valores são dados em Δ CT.

Amostra	Δ CT de cada gene		
	NGFR	CSPG4	CD34
FEV CTMs-TA	6,40	2,54	1,29
CTMs+EOMA -Matrigel® (3 dias) ¹	15,66	9,73	ND
EOMA - Matrigel® (3 dias)	ND	ND	ND
CTMs-TA - Matrigel® (3 dias)	10,85	7,72	ND
CTMs-TA+EOMA - 2D (3 dias) ²	16,54	11,56	ND
EOMA - 2D (3 dias)	ND	ND	ND
CTMs-TA - 2D (3 dias)	12,21	6,83	10,51
CTMs-TA +EOMA-Matrigel® (7 dias) ¹	5,86	5,50	7,40
EOMA - Matrigel® (7 dias)	ND	ND	7,57
CTMs-TA +EOMA-Matrigel® (7 dias) ²	7,85	4,10	6,62
CTMs-TA - Matrigel® (7 dias)	5,15	1,97	6,47

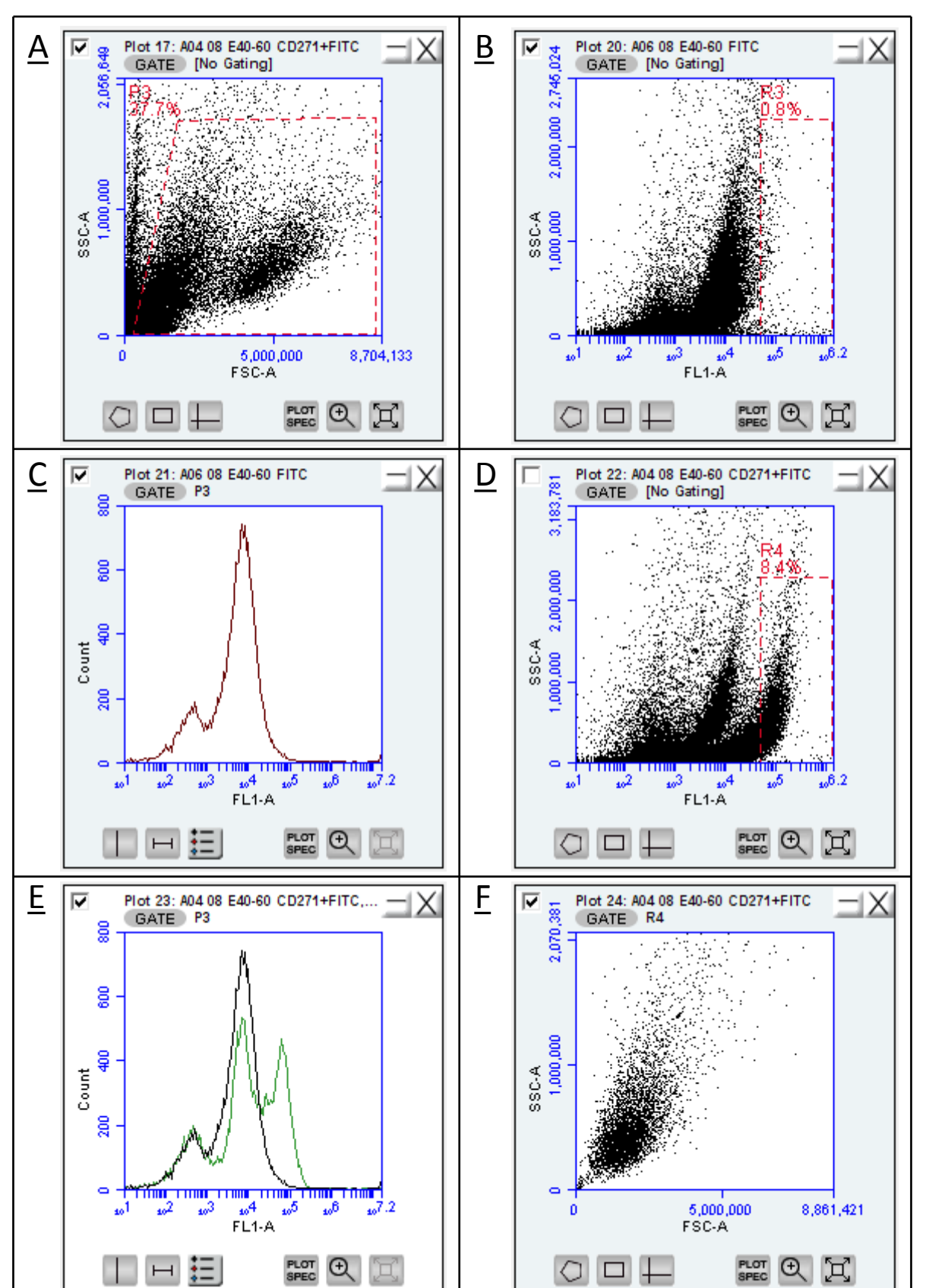
¹CTMs plaqueadas posteriormente às células EOMA.
²Cocultivo simultâneo.
ND: Valores não detectáveis.
FEV: Fração estromal-vascular do tecido adiposo.

Análise da expressão dos genes NGFR, CSPG4 e CD34, através de PCR em tempo real, nos cocultivos de CTMs e rBMECs e das células sozinhas, tanto em Matrigel® quanto em 2D. Os valores são dados em Δ CT.

Amostra	Δ CT de cada gene		
	NGFR	CSPG4	CD34
FEV CTMs-TA	6,40	2,54	1,29
CTMs+rBMECs -Matrigel® (3 dias) ^a	ND	3,20	ND
rBMECs - Matrigel® (3 dias)	ND	ND	ND
CTMs-TA - Matrigel® (3 dias)	ND	ND	ND
CTMs+rBMECs -Matrigel® (3 dias) ^b	ND	3,43	ND
CTMs+rBMECs - 2D (3 dias) ^a	ND	3,90	8,28
rBMECs 2D (3 dias)	ND	ND	7,77
CTMs+rBMECs - 2D (3 dias) ^b	ND	2,66	6,59
CTMs-TA - 2D (3 dias)	ND	ND	ND
CTMs+rBMECs -Matrigel® (7 dias) ^a	ND	4,00	ND
rBMECs - Matrigel® (7 dias)	ND	ND	ND
CTMs-TA - Matrigel® (7 dias)	ND	ND	ND
CTMs+rBMECs -Matrigel® (7 dias) ^b	ND	5,86	ND
CTMs+rBMECs - 2D (7 dias) ^a	ND	6,46	10,37
rBMECs - 2D (7 dias)	ND	ND	ND
CTMs+rBMECs - 2D (7 dias) ^b	ND	6,35	10,91
CTMs-TA - 2D (7 dias)	ND	2,93	4,48

^aCTMs plaqueadas posteriormente às rBMECs.
^bCocultivo simultâneo.
ND: Valores não detectáveis.
FEV: Fração estromal-vascular do tecido adiposo

Citometria de fluxo para detecção de CD271 em CTMs humanas após cocultivo com células endoteliais. CTMs e células endoteliais humanas foram cocultivadas em esferoides por uma semana. Ao final do cocultivo, os esferoides foram enzimaticamente dissociados e marcados com um anticorpo anti-CD271 ou com um controle de isotipo (controle negativo). (A) Gráfico FSC-A x SSC-A, no qual uma região que incluía células integras foi delimitada. (B) Gráfico de pontos da intensidade de fluorescência (FL1-A) do controle negativo. (C) Histograma da intensidade de fluorescência do controle negativo. (D) Gráfico de pontos da intensidade de fluorescência (FL1-A) das células marcadas com o anticorpo CD271, no qual uma região foi desenhada para realçar as células positivas, que correspondiam a pelo menos 8,4% do total de células analisadas. (E) Sobreposição dos histogramas de intensidade de fluorescência do controle negativo (linha preta) e das células marcadas com o anticorpo CD271 (verde). (F) Gráfico FSC-A x SSC-A da região delimitada em (D), no qual é possível verificar-se que as células positivas para CD271 correspondem às células com menor tamanho na região delimitada em (A).



Conclusões e perspectivas

Dos sistemas de cocultivo empregados, o sistema de cocultivo em hidrogel foi o menos adequado por não permitir um contato próximo entre CTMs e células endoteliais. Já o sistema de cocultivo em Matrigel® explorou o contato entre CTMs e células endoteliais que formaram estruturas rudimentares semelhantes a vasos sanguíneos, mas neste sistema a expressão do marcador CD271 não foi constatada de forma conspícua. Os resultados indicam que pelo menos uma fração das CTMs que são cocultivadas com células endoteliais em esferoides passam a expressar CD271. Dada a especificidade desse marcador, que é expresso em pericitos recém isolados mas que não é expresso por pericitos expandidos em cultura (da Silva Meirelles et al., Stem Cells Dev. 2015, doi:10.1089/scd.2015.0153), é provável que essas células assumiram um fenótipo pericítico. Isso indica que o sistema cocultivo de CTMs e células endoteliais em esferoides é o mais apropriado para este estudo. Experimentos adicionais são necessários para validar esta possibilidade. Inclui-se, entre esses experimentos adicionais, o isolamento das células positivas para CD271 para verificação, por PCR em tempo real, da expressão de RNA que codifica as moléculas NG2 e CD34.

Agradecimentos

Os resultados aqui apresentados são fruto do trabalho de estudantes de pós-graduação e iniciação científica do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, em boa parte do estudante Bruno Corrêa Bellagamba.

Este projeto contra com financiamento do CNPq (Edital Universal 2013) e da FAPERGS (Edital Pesquisador Gaúcho 2013).