



ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Gabriela da Silva Peters¹; Lindolfo da Silva Meirelles²;

^[1] Aluna do curso de graduação em Biomedicina-ULBRA Canoas – Bolsista PROBIC/FAPERGS– gabriela.peters@gmail.com
^[2] Prof. Dr. Lindolfo da Silva Meirelles – ULBRA -Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

INTRODUÇÃO

Células endoteliais (ECs, do inglês *Endothelial Cells*) estão presentes no lúmen dos vasos sanguíneos e secretam substâncias biologicamente ativas que controlam a integridade e o metabolismo da parede vascular (revisado em TOBOREK, KAISER, 1999). A formação de novos vasos sanguíneos exige uma atividade comportamental considerável das células endoteliais, incluindo sua proliferação, migração (YOSHIDA A, ANAND-APTE B, ZETTER BR, 1996) e diferenciação em matrizes tubulares. Sabe-se que as ECs isoladamente têm a capacidade de estimular angiogênese (CHEKANOV V, AKHTAR M, TCHEKANOV G, et al., 2003).

As células-tronco mesenquimais (do inglês *mesenchymal stem cell*, MSCs) são encontradas em quase todos os órgãos e tecidos pós-natais por estarem associadas aos vasos sanguíneos (MEIRELLES, CHAGASTELLES, NARDI, et al., 2006). Caracterizam-se por ser uma população rara de células-tronco multipotentes, capazes de diferenciar-se em diversas linhagens celulares como os condrócitos, osteócitos, adipócitos e tenócitos (CAPLAN, et al., 1991). A angiogênese necessária para o reparo tecidual de tecidos vascularizados, por exemplo, é estimulada por MSCs derivadas de tecido adiposo (LISIECKI et al., 2014).

OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo analisar as interações entre MSCs e ECs *in vitro* e investigar possíveis alterações fenotípicas induzidas pelo contato entre essas células durante o cocultivo.

METODOLOGIA

As ECs de coração de rato Lewis, foram isoladas com metodologia estabelecida em nosso laboratório e que ainda não foi publicada e cultivadas em atmosfera umidificada a 37°C e com teor de 5% de CO₂. Foram aderidas ao plástico com meio de cultura de Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) com 2,2g/l de concentração de bicarbonato de sódio, suplementado com ácido 4-(2-Hidroxi-etil) piperazin-1-etanol-sulfônico (HEPES), 10% de soro fetal bovino e antibióticos. A troca do meio de cultura das garrafas ocorreu entre 48 e 72 horas. As células mesenquimais de coração de rato Lewis e humanas foram cultivadas nas mesmas condições que as ECs de rato, com exceção da quantidade de bicarbonato de sódio adicionado ao meio DMEM, para MSCs que utilizamos 3,7g/l de bicarbonato.

As cinéticas de cultivo das ECs de rato Lewis e MSCs do doador 1 foram realizadas em garrafas de 25 cm² em triplicata, adicionando um total de células iniciais de 1x10⁵ após contagem, 4000 células por cm². Na citometria de fluxo, as ECs foram contadas, ressuspensas em PBS com 2% de SFB, e dispensadas em tubos de citometria. Um dos tubos foi usado como controle negativo (somente células). Um tubo recebeu 5µl de iodeto de propídio (PI) para identificação de células mortas, e outro tubo recebeu 1µl anticorpo anti-CD31 marcado com eFluor 660. Os tubos foram incubados durante 40 minutos na geladeira. Após essa incubação, os três tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi desprezado. As células de todos os tubos foram ressuspensas em 300µl de PBS com 2% de SFB. As amostras contidas nos tubos foram analisadas em um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Para os experimentos de vasculogênese, foi utilizado o extrato de matriz extracelular (ECM Gel) (Sigma-Aldrich), obtido de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm murino. Foram realizados três ensaios de vasculogênese.

RESULTADOS ALCANÇADOS

Nas cinéticas de cultivo I (figura 1) e II (figura 2) das ECs de rato Lewis, obtivemos uma média de, respectivamente, 0,533 e 0,443 duplicações por dia da população inicial. O tempo de duplicação foi de aproximadamente 45 horas para a cinética I e 54 horas para a cinética II.

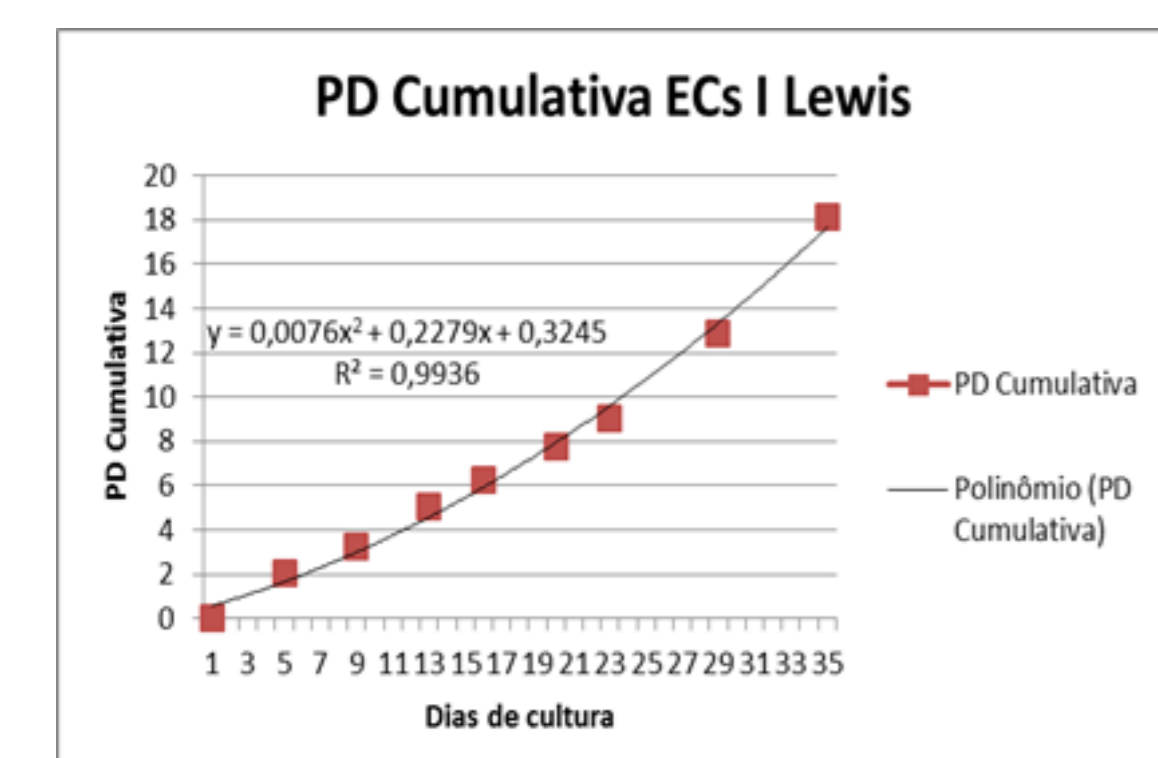


Figura 1: gráfico representativo das duplicações de população (PD) das ECs de rato Lewis I, em garrafa de 25cm², durante cinética de cultivo

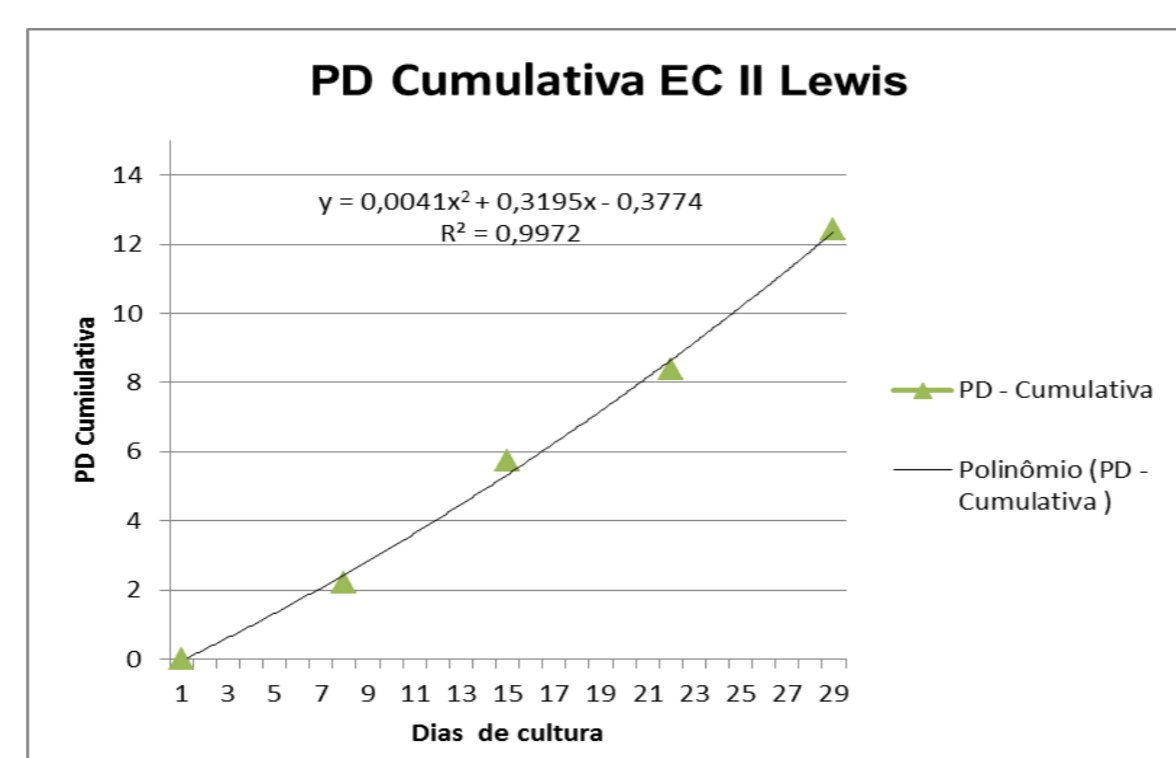


Figura 2: gráfico representativo das duplicações de população (PD) das ECs II de rato Lewis, em garrafa de 25cm², durante cinética de cultivo.

Foi realizada a cinética de cultivo com as células mesenquimais humanas do doador 1 (figura 3). Observamos uma média de 0,216 duplicações por dia, sendo necessário no mínimo 4 dias para que houvesse uma duplicação de sua população inicial.

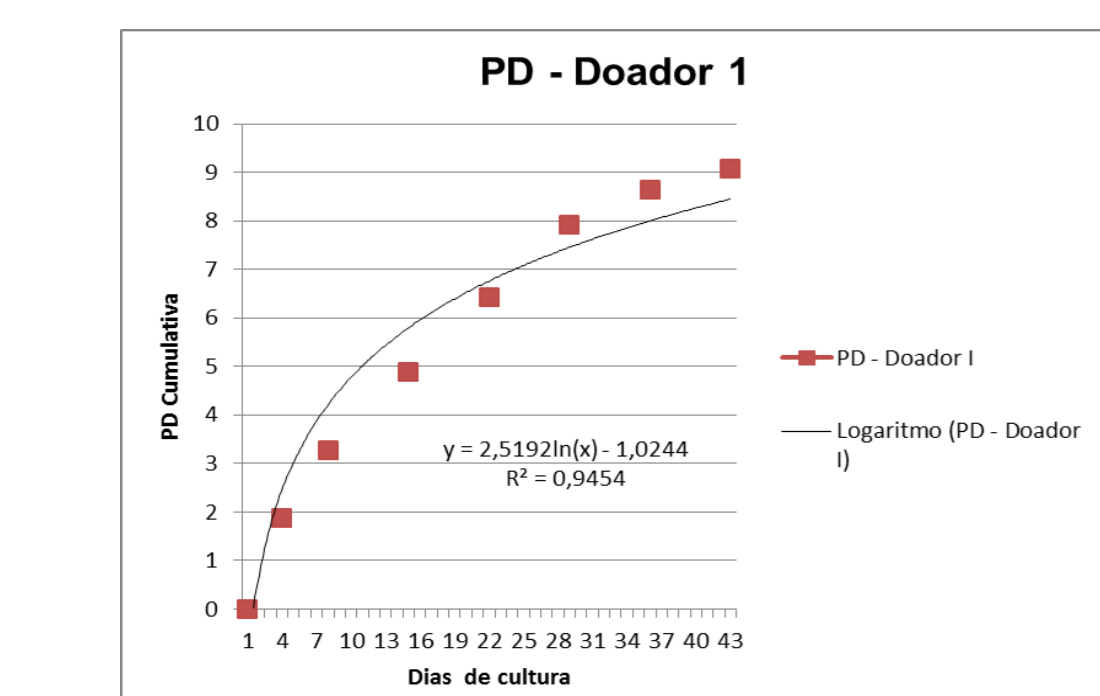


Figura 3: gráfico representativo das duplicações de população (PD) das MSCs de tecido adiposo humano do doador 1, em garrafa de 25cm² durante cinética de cultivo.

CONCLUSÕES

Realizaram-se duas cinéticas de cultivos das células endoteliais observando-se assim uma média de 0,533 duplicações por dia da população inicial para a primeira cinética e 0,443 duplicações por dia para a segunda cinética, sendo o tempo de duplicação da população inicial, 45 e 54 horas, respectivamente. Para as MSCs de tecido adiposo humano foi observada uma média de 0,216 duplicações por dia, sendo necessárias 96 horas para que houvesse uma duplicação de sua população inicial. Com a citometria de fluxo constatamos que as células endoteliais são positivas para CD31, o que comprova a natureza endotelial das mesmas. Com os ensaios de vasculogênese observamos que as ECs apresentaram uma melhor adaptação ao meio MCDB 131 com 7,5% de SFB e fatores de crescimento do que os demais meios testados neste trabalho. Tanto células MSCs de tecido adiposo humano quanto MSCs de rato Lewis quando cultivadas junto com ECs de rato Lewis sobre ECM formaram pequenas estruturas que podem se assemelhar a uma rede primária de túbulos sanguíneos.

As ECs foram analisadas também por citometria de fluxo. Conforme o gráfico de pontos, observamos que mais de 90% das células estariam vivas e viáveis para sua utilização e 8,7% das células acabaram incorporando o PI, estariam assim inviáveis ou mortas (conforme figura 4). Observou-se que as ECs marcadas com o anticorpo CD31 (figura 4, pico verde) apresentaram uma fluorescência maior que as células utilizadas como controle e que não foram marcadas (figura 4, pico preto). Pudemos então concluir que estas células fluorescentes apresentaram este marcador de superfície que é característico de célula endotelial, o que confirmou sua natureza endotelial.

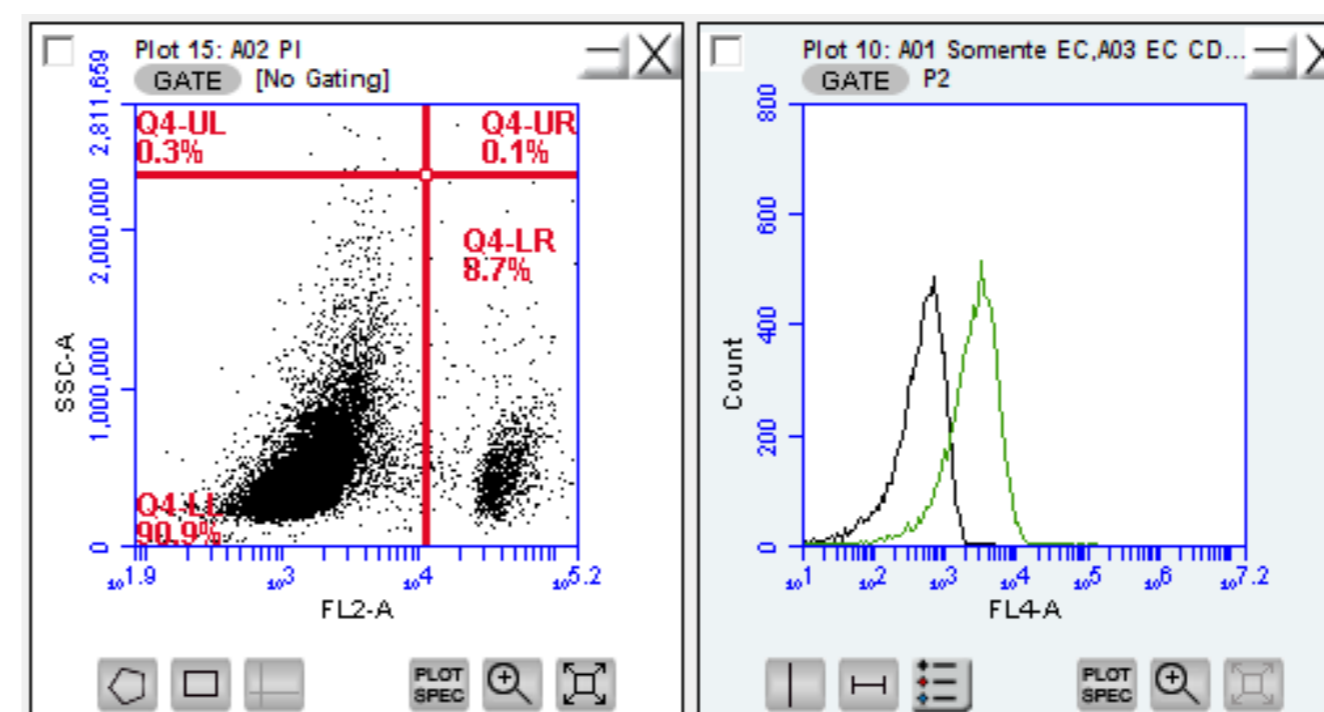


Figura 4: Gráficos representativos da citometria de fluxo das ECs de rato Lewis. No primeiro gráfico observamos que cerca de 8,7% das células incorporam PI, enquanto mais de 90% das células estavam viáveis. No segundo gráfico, as curvas representam as células marcadas com o anticorpo CD31 (curva verde) e as células que não foram marcadas (curva preto).

No experimento de vasculogênese contendo ECs e MSCs de rato Lewis, observamos que apenas dois poços contendo apenas células endoteliais formaram pequenas estruturas que se assemelham a rudimentos de vasos sanguíneos (figura 1). O ensaio foi observado por 72 horas e os demais poços não formaram estruturas.

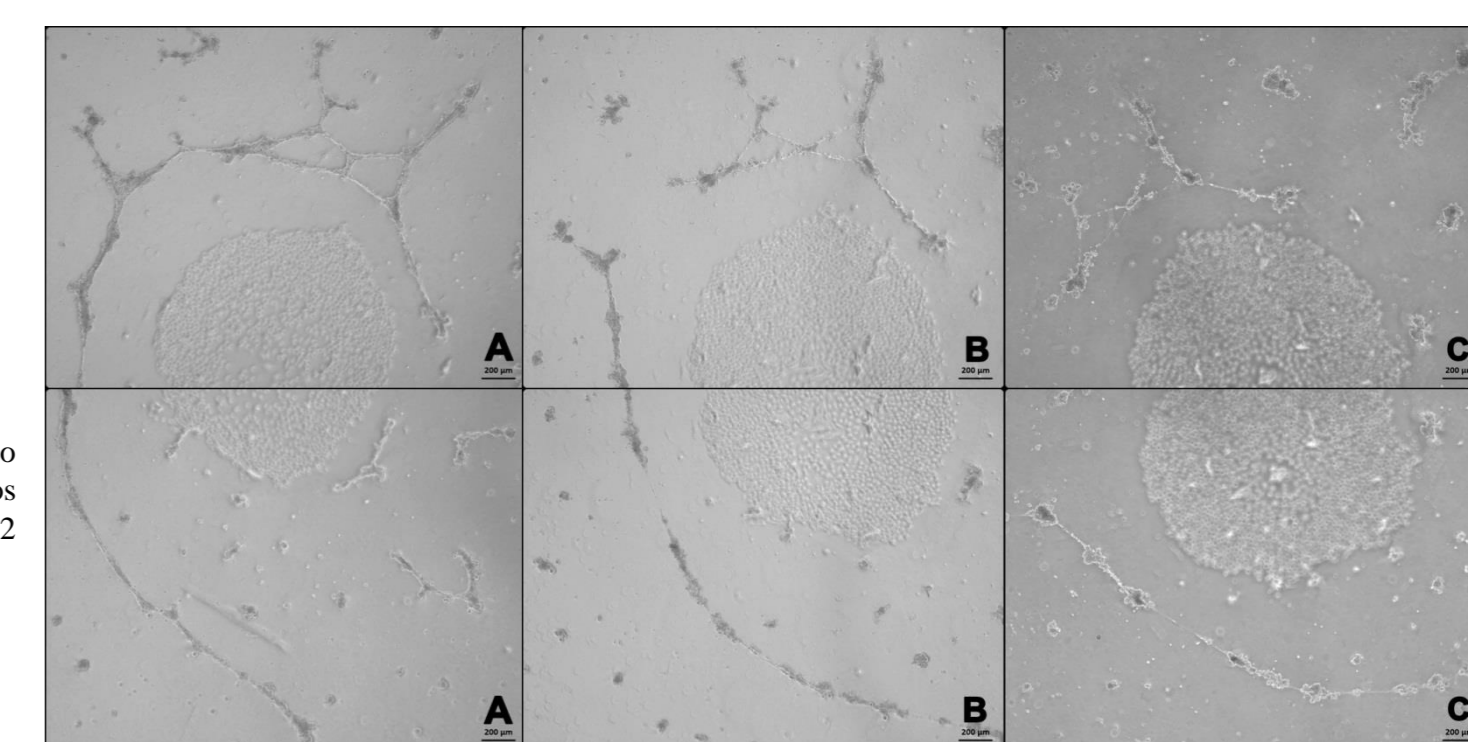


Figura 5: As imagens A (24 horas), B (48 horas) e C (72 horas) em aumento de 50x mostram o resultado do experimento de vasculogênese. Os poços continham células ECs de rato Lewis cultivadas sobre ICM em placa de 12 poços em lâmina de 15mm e meio DMEM contendo 2% de SFB.

Diferentes meios foram testados no segundo ensaio de vasculogênese para que pudéssemos observar o comportamento das células endoteliais em diferentes concentrações e meios de cultivos. Obteve-se o melhor resultado utilizando o meio MCDB 131 com 7,5% de SFB e fatores de crescimento sem heparina, quando comparado com os demais meios utilizados, ocorrendo à formação de pequenas estruturas tubulares semelhantes a capilares sanguíneos. Os poços que não continham heparina e com os meios HDMEM e MCDB 131 com 10% 5% de SFB apresentaram pouquíssima ou nenhuma mudança estrutural celular, conforme podemos observar na figura 6.

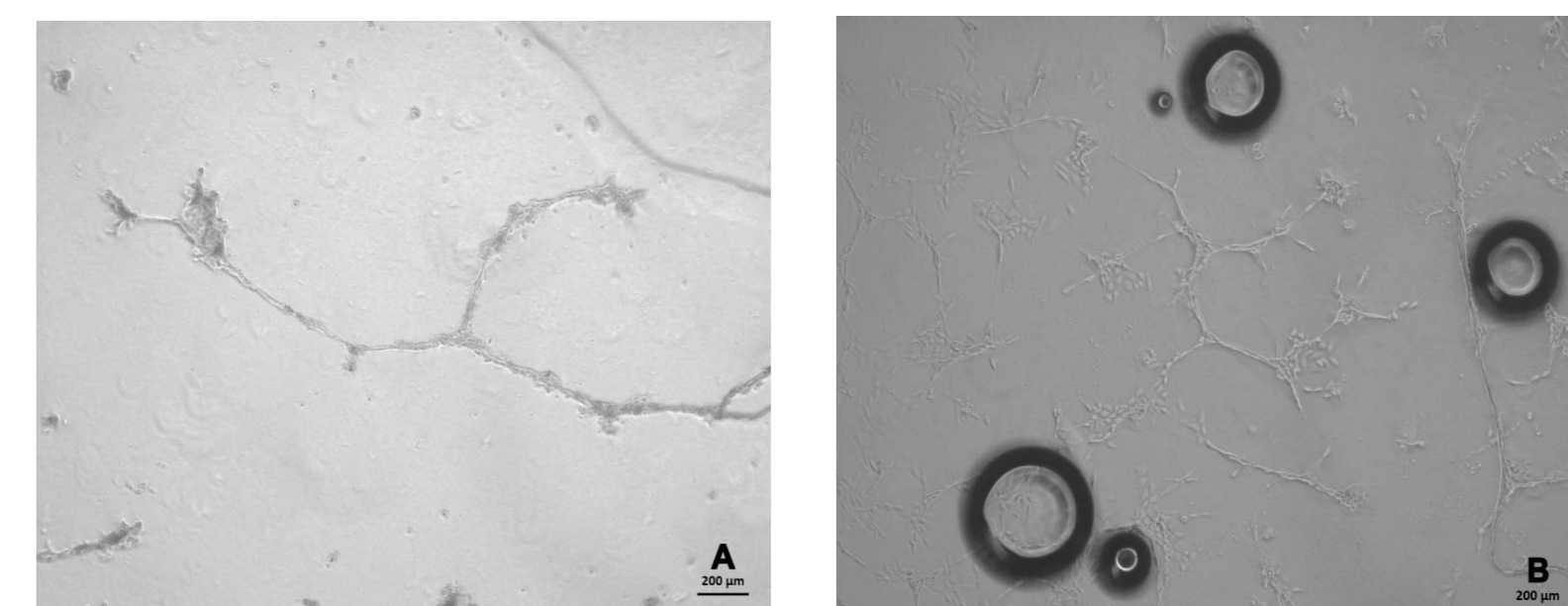


Figura 6: As imagens A e B em aumento de 50x foram tiradas após 24 horas de cultivos das ECs de rato Lewis em placa de 24 poços com lâminas de 13mm contendo ECM. Na figura A possuímos ECs cultivadas em meio MCDB com 5% de SFB. A figura B representa ECs cultivadas com meio MCDB 131 com 7,5% de SFB e fatores de crescimento. Podemos constatar que a imagem B apresentou uma maior formação de estruturas semelhantes a capilares sanguíneos, quando comparada a imagem A.

O experimento de cocultivo realizado com ECs de rato Lewis e MSCs de humano do doador 1 apresentaram a formação de estruturas parecidas a rudimentos de vasos sanguíneos em poços onde ECs e MSCs foram adicionados concomitantemente (figura 7). Os poços onde MSCs foram adicionadas após 24 de cultivo das ECs, as primeiras horas foram observadas e constatou-se a formação de pequenas estruturas apenas com as ECs, mas essas não se mantiveram até a inserção das MSCs humanas.

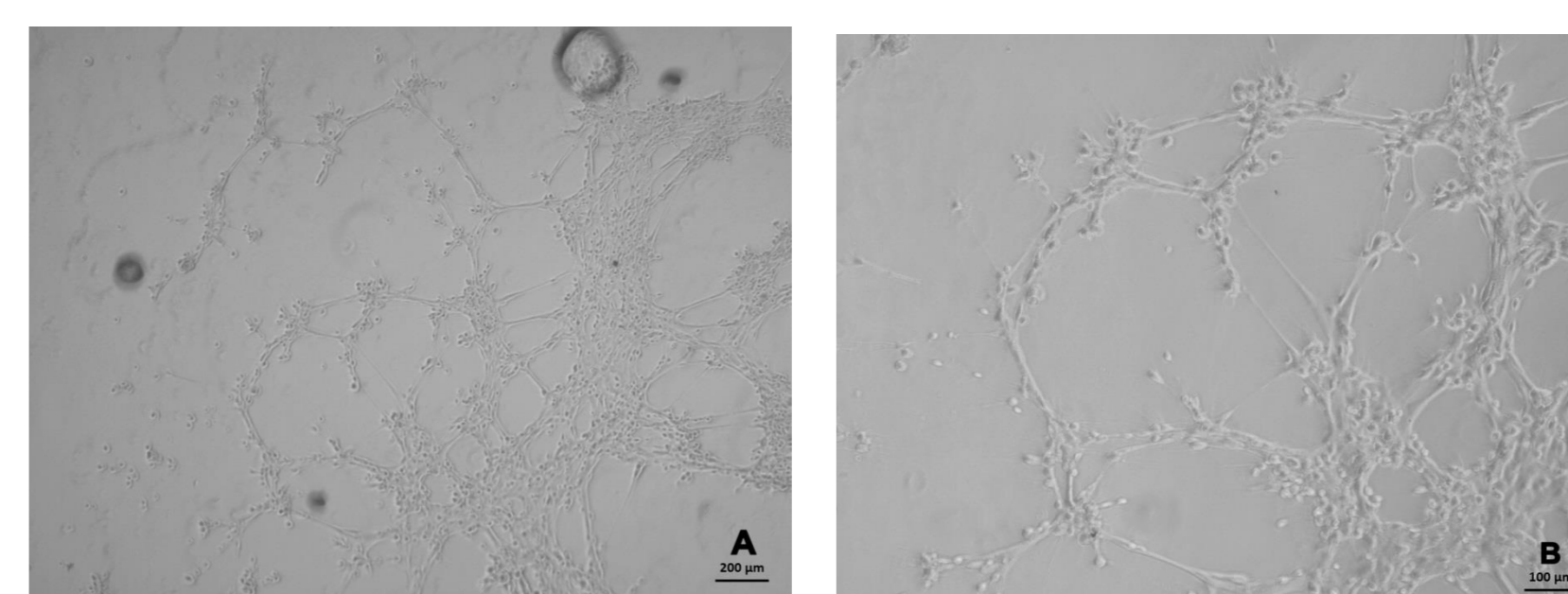


Figura 7: As figuras A (50x) e B (100x) representam a mesma imagem, mas em aumentos diferentes. Houve a formação de estruturas simples similares a rudimentos de vasos sanguíneos em suas primeiras 24 horas de cocultivo das ECs de rato Lewis e MSCs de tecido adiposo humano do doador 1. O Cocultivo foi realizado em placa de 24 poços sobre lâmina de 13mm contendo ECM e meio MCDB 131 com 10% de SFB e fatores de crescimento.