



ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Autores: Gabriela da Silva Peters – Iniciação Científica PPGBioSaúde
Patrícia Grudizinski – Doutoranda PPGBioSaúde
Bruno Bellagamba – Doutorando PPGBioSaúde
Heveline Roesch – Mestranda PPGBioSaúde

Resumo

Células-tronco mesenquimais 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. Vasculogênese e angiogênese são processos fundamentais para a formação de novos vasos sanguíneos. A formação de novos vasos sanguíneos exige uma atividade comportamental considerável das células endoteliais, incluindo sua proliferação e diferenciação em matrizes tubulares. Através da cinética de cultivo observamos o comportamento das células-tronco mesenquimais e células endoteliais quando cultivadas em atmosfera umidificada a 37°C e com teor de 5% de CO₂. Marcadores de CD31 presentes em células endoteliais foram confirmados nas células endoteliais de rato Lewis através da citometria de fluxo. Experimentos de vasculogênese ajudaram a aperfeiçoar metodologia e materiais para o cocultivo de células-tronco mesenquimais e células endoteliais. Tanto células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano quanto células-tronco mesenquimais de rato Lewis quando cultivadas junto com células endoteliais de rato Lewis sobre ECM formam pequenas estruturas que podem se assemelhar a uma rede primária de túbulos sanguíneos.

Palavras chave: Vasculogênese; cocultivo; Angiogênese;

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, ANAND-APTE, ZETTER, 1996) e diferenciação em matrizes tubulares. Sabe-se que as ECs isoladamente têm a capacidade de estimular angiogênese (CHEKANOV, AKHTAR, TCHEKANOV, 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).

Este estudo teve 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-Hidroxietil) piperazin-1-etanol sulfônico (HEPES), 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, São Paulo – SP) e antibióticos. A lavagem das monocamadas celulares aderidas nas garrafas de cultura foi feita com solução de Hank acrescido de 0,5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e piruvato de sódio (0,1µM). As ECs foram desprendidas com tripsina com concentração de 0,25%. 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. Além disso, a concentração de tripsina utilizada nas MSCs foi 0,025%.

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. O cálculo utilizado para contabilização do número de duplicações da população (DP) celular das garrafas foi $DP = [\text{Log}(\text{número final de células}) - \text{Log}(\text{número inicial de células})] / \text{Log}2$. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer, combinada com 20 µL da amostra de células e 20 µL de corante Azul Tripán. Células que incorporaram o corante foram consideradas não viáveis.

Na citometria de fluxo, as ECs foram contadas, ressuspendidas em PBS com 2% de SFB, e dispensadas em tubos de citometria (1x10⁵ células por tubo em 50 µl de PBS). 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 ressuspendidas 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. Todo o material plástico utilizado foi mantido refrigerado antes e durante a realização do experimento. Lamínulas de 13 mm e 15 mm de diâmetros foram colocadas nos poços de placas de 24 e 12 poços e em seguida adicionou-se 50µL e 60µL, respectivamente, de ECM sobre de cada lamínula. A placa contendo o ECM sobre a lamínula foi encubada em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e com teor de 5% de CO₂ por no mínimo

meia hora para que a matriz extracelular possa polimerizar-se. As células foram coletadas através do tratamento com tripsina e semeadas em 3 grupos distintos, poços apenas com ECs, poços com ECs e MSCs de rato Lewis e poços com ECs de rato Lewis e MSCs de humano.

Foram realizados três ensaios de vasculogênese. No primeiro utilizamos EC e MSC de rato Lewis, utilizando DMEM com 2% de SFB. Em um segundo ensaio buscou-se observar a atividade celular das ECs de rato Lewis quando submetidas aos meios DMEM com 10% e 5% de SFB, MCDB 131 com 10% ou 5% de SFB, e MCDB 131 com 7,5% de SFB e fatores de crescimento. Acrescentou-se 5 U/ml de heparina a um poço de cada condição. No cocultivo realizado com ECs de rato Lewis e MSCs do tecido adiposo do doador 1, adicionou-se 50µl de ECM em três lamínulas. O experimento foi dividido em um poço contendo apenas ECs, um poço com ECs e MSCs adicionadas concomitantemente, e um poço com ECs às quais MSCs foram adicionadas após 24 horas de cultivo das ECs. O meio utilizado foi o MCDB 131 com 7,5% de SFB e fatores de crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas cinéticas de cultivo I e II 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. Para a cinética de cultivo das células mesenquimais humanas do doador 1 observou-se uma média de 0,216 duplicações por dia, sendo necessário no mínimo 4 dias para que houvesse uma duplicação.

As ECs foram analisadas também por citometria de fluxo. 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. ECs marcadas com o anticorpo CD31 apresentaram uma fluorescência maior que as células utilizadas como controle e que não foram marcadas. Concluímos que estas células fluorescentes apresentaram este marcador de

superfície que é característico de célula endotelial, o que confirmou sua natureza endotelial.

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.

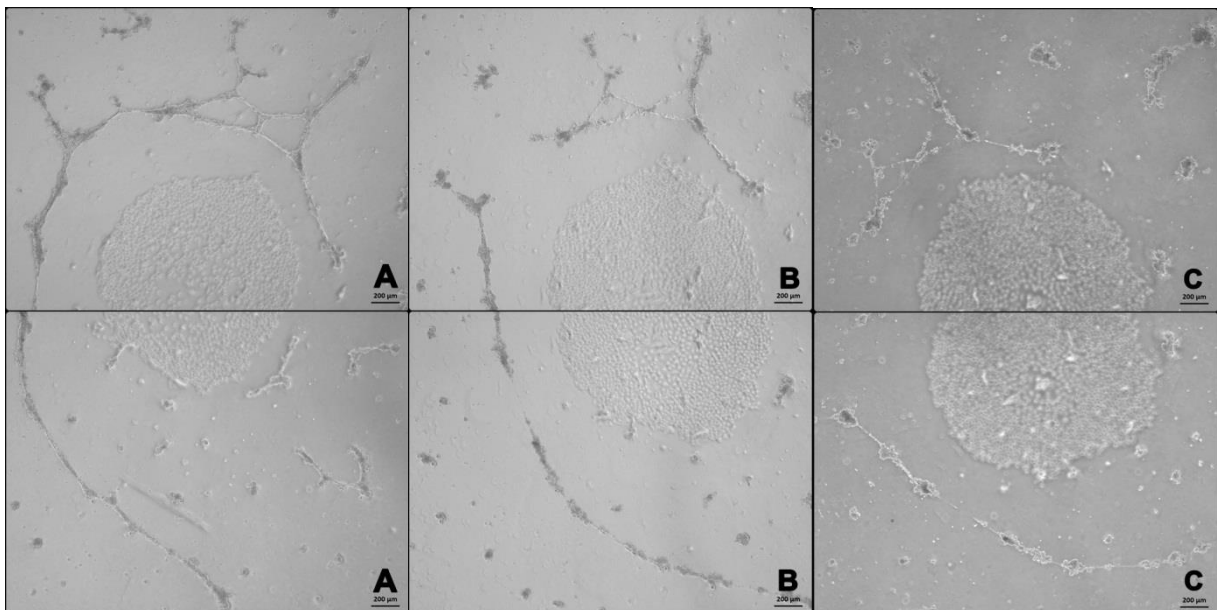


Figura 1: Células Endoteliais A (24 horas), B (48 horas) e C (72 horas) em aumento de 50x cultivadas sobre ECM em placa de 12 poços em lamínula de 15mm e meio DMEM contendo 2% de SFB.

No segundo ensaio de vasculogênese, dos meios testados 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 (figura 2).

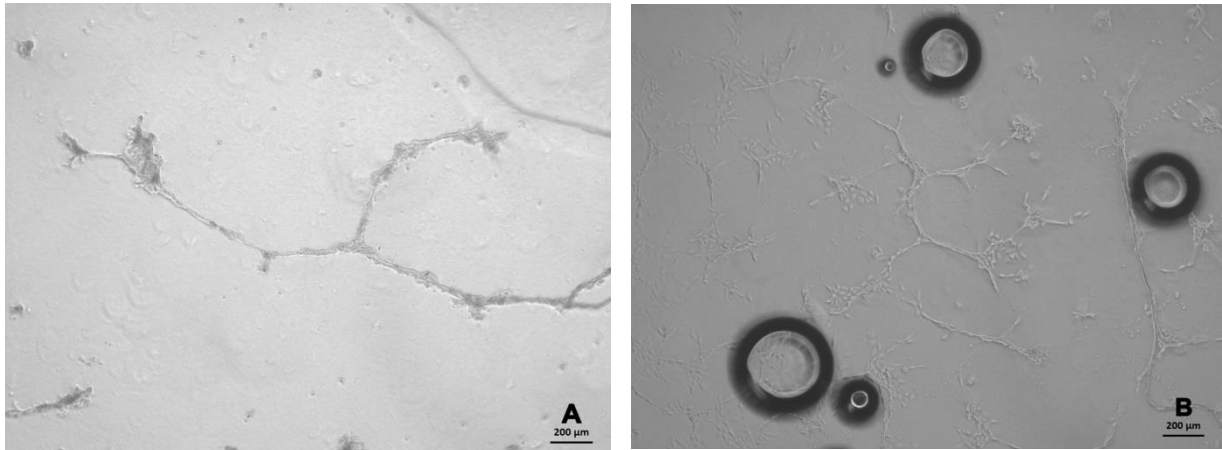


Figura 2: Cultivo das células endoteliais de rato Lewis. Na figura A possuímos ECs cultivados em meio MCDB com 5% de SFB. A figura B representa ECs cultivadas com meio MCDB 131 com 7,5% de SFB e fatores de crescimento.

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 3). 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.

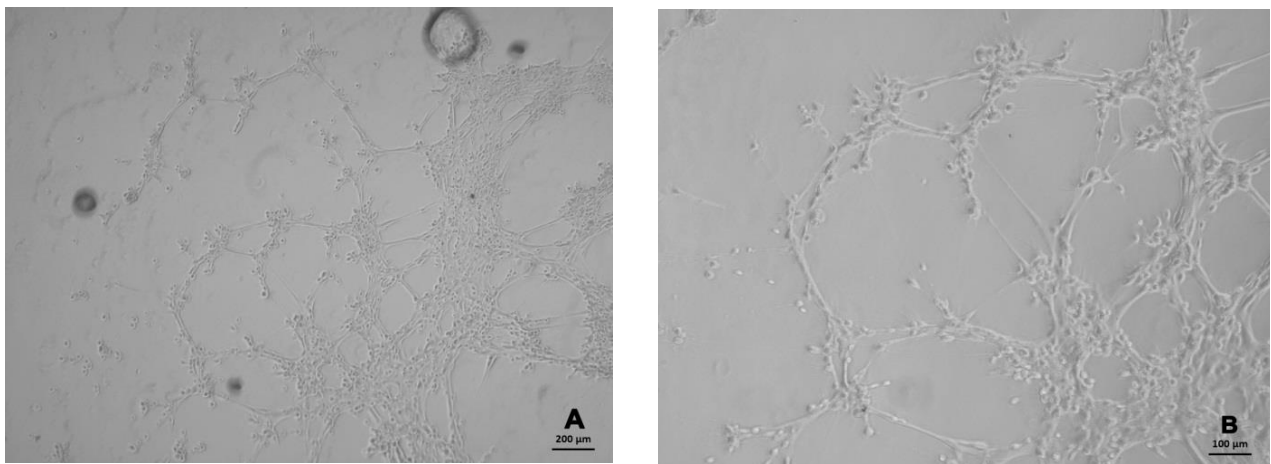


Figura 3: 24 horas de cocultivo das ECs de rato Lewis e MSCs de tecido adiposo humano do doador 1 em meio MCDB 131 com 10% de SFB e fatores

de crescimento. As figuras A (50x) e B (100x) representam a mesma imagem, mas em aumentos diferentes.

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.

Referências

CAPLAN AI. **Mesenchymal stem cells**. J Orthop Res, 1991. Sep;9(5):641-50.

CHEKANOV V, AKHTAR M, TCHEKANOV G, et al. **Transplantation of autologous endothelial cells induces angiogenesis** (Pacing Clin Electrophysiol) 2003. 26:496-9.

Da silva MEIRELLES L.; CHAGASTELLES PC, NARDI NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues**. 2006. J Cell Sci., v. 119, p. 2204-13,

LISIECKI J., et al. **Adipose derived mesenchymal stem cells from ventral hernia repair patients demonstrate decreased vasculogenesis.** 2014. Biomed Res Int., v. 2014, Article ID 983715.

TOBOEREK M, KAISER S. **Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis.** (Basic Res Cardiol.) 1999, 94:295-314.

YOSHIDA A, ANAND-APTE B, ZETTER BR. **Differential endothelial migration and proliferation top basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor.** 1996. (Growth Factors) 13: 57-64.

