

COMPARAÇÃO DE CÉLULAS PERIVASCULARES COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Grudzinski PB*, Bellagamba BC, dos Santos TA, da Silva Meirelles L. PPG BioSaúde \ULBRA

Introdução:

Células estromais mesenquimais (MSC) são definidas como células com capacidade de proliferação *in vitro* e diferenciação em células mesenquimais. Mesmo sendo facilmente isoladas por sua aderência ao plástico, MSC constituem uma população celular heterogênea. A utilização de marcadores de superfície para obtenção de uma população de MSC mais bem definida vem sendo alvo de diversos estudos; porém, não há um marcador específico para MSC, e há discordância quanto aos melhores tipos de marcadores para o isolamento dessas células. Diversos estudos afirmam que as MSC são originárias de células perivasculares denominadas pericitos, que dão origem às MSC quando cultivadas. Recentemente, demonstrou-se que pericitos de tecido adiposo humano apresentam, em sua superfície, a molécula CD271.

Objetivos:

O objetivo geral deste trabalho foi isolar células do tecido adiposo humano a partir da imunoseleção positiva para o marcador CD271 e negativa para CD31 juntamente com um passo de seleção positiva das células que aderem ao plástico de placas de cultura, e avaliar o perfil de moléculas de superfície e o potencial dessas células na proliferação *in vitro* em comparação a ATMSC isoladas a partir da aderência ao plástico.

Materiais e Métodos:

Para testar essa pressuposição, células de tecido adiposo humano foram isoladas com o uso de um protocolo de aderência celular ao plástico das placas de cultivo, seguido de imunoseleção negativa para CD31 e positiva para CD271. As células obtidas por essa metodologia, denominadas células AD271+31- foram comparadas com células duplamente negativas para os marcadores CD271 e CD31 (AD271-31-) e com células estromais mesenquimais de tecido adiposo isoladas por aderência ao plástico (ATMSC) quanto a marcadores de superfície, cinética de cultivo e capacidade de formação de colônias fibroblastoides.

Resultados:

Doador	Posição anatômica de origem do tecido e quantidade processada	Quantidade de células totais isoladas do AT (SVF) por mL de tecido processado	Frequência de células AD271+31- isoladas*	Frequência de células AD271+31- isoladas*
01	Abdominal 200 mL	9 x 10 ⁴	14,66%	0,13%
02	Abdominal 300 mL	15 x 10 ⁴	3,91%	0,01%
03	Braço 250 mL	20 x 10 ⁴	14,42%	0,5%
04	Abdominal 450 mL	21 x 10 ⁴	19,9%	0,32%
05	Abdominal 500mL	20 x 10 ⁴	47%	2,2%
06	Abdominal 400 mL	32 x 10 ⁴	23,3%	0,35%
	Médias	19,5 x 10 ⁴	20,53%	0,59%

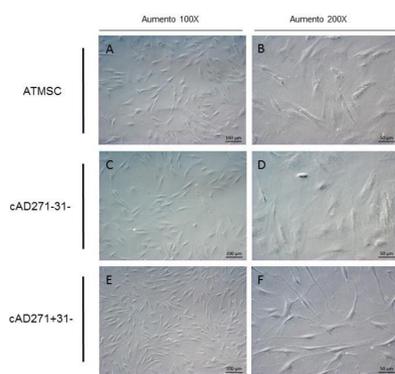


Figura 1: Morfologia das células AD271+31-, AD271-31- e ATMSC. Fotomicrografias representativas de cultivos de ATMSC em aumento de 100X (A) e em aumento de 200X (B); AD271-31- em aumentos de 100X (C) e 200X (D); e AD271+31- em 100X (E) e 200X (F). As células representadas são do doador 04 e estavam na passagem 3 de cultivo.

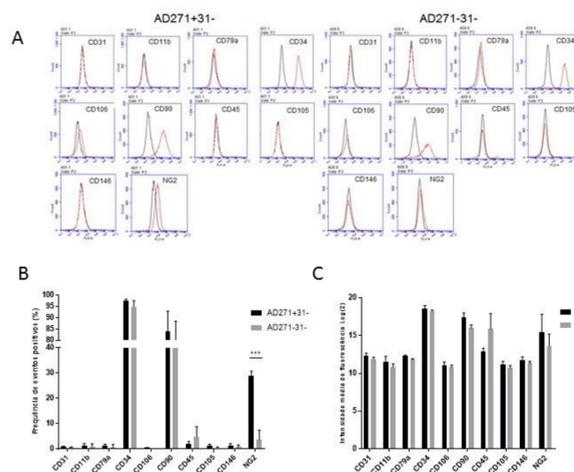


Figura 2: Perfil de moléculas de superfície de células AD271+31- e AD271-31- recém-isoladas. Histogramas representativos da análise de marcadores de superfícies de células AD271+31- e AD271-31- recém-isoladas (A). Gráfico da média de frequências de eventos positivos das moléculas de superfície de células AD271+31- e AD271-31- recém isoladas (n=4; ***p<0,001) (B). Gráfico da intensidade média de fluorescência (log(2)) das moléculas de superfície de células AD271+31- e AD271-31- recém-isoladas (C).

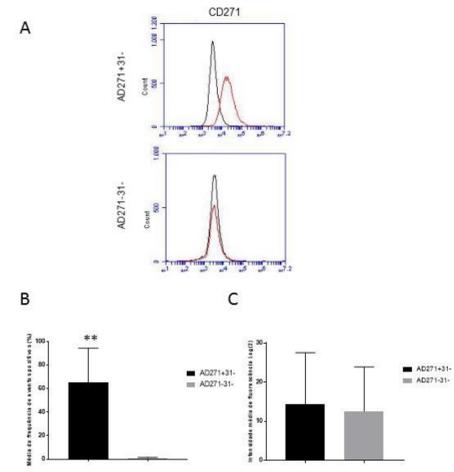


Figura 3: Pureza do isolamento imunomagnético para CD271. Histogramas representativos de células AD271+31- e AD271-31- marcadas com CD271 (A). Gráfico comparando a média da frequência de eventos positivos para CD271 das células AD271+31- e AD271-31- (n=3) (B). Gráfico da intensidade média de fluorescência (log(2)) de eventos positivos para CD271 nas células AD271+31- e AD271-31- (n=3) (C).

Tabela 1: Posição anatômica de origem das amostras de tecido adiposo, volume processado, quantidade de células totais isoladas e frequência de células AD271+31- e AD271-31- de cada doador.

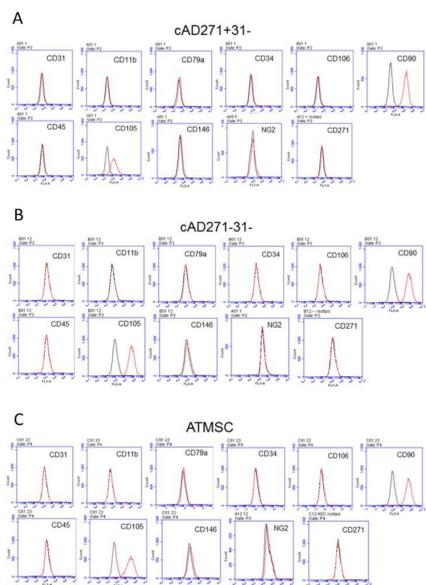


Figura 4: Perfil de moléculas de superfície de células cAD271+31- e cAD271-31- e ATMSC. Histogramas representativos da análise de marcadores de superfícies de células cAD271+31- (A), cAD271-31- (B) e ATMSC (C).

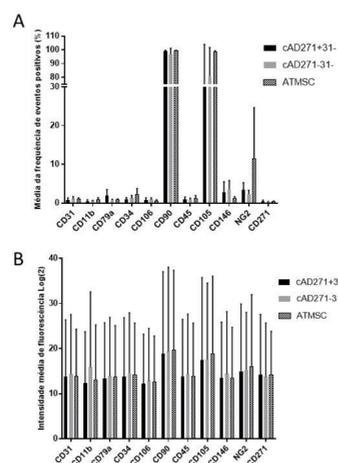


Figura 5: Gráfico da média de frequências de eventos positivos e da intensidade média de fluorescência das moléculas de superfície de células cAD271+31-, cAD271-31- e ATMSC. Gráfico da média de frequências de eventos positivos das moléculas de superfície de células cAD271+31-, cAD271-31- e ATMSC (n=4) (A). Gráfico da intensidade média de fluorescência (log(2)) das moléculas de superfície de células cAD271+31-, cAD271-31- e ATMSC (n=4) (B).

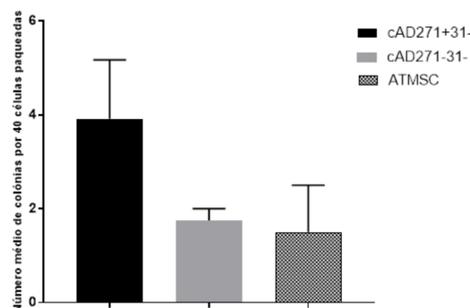


Figura 6: Ensaio de CFU-F. Gráfico do número médio de colônias por 40 células cAD271+31-, cAD271-31- e ATMSC plaqueadas (n=4 do doador 06, média±DP).

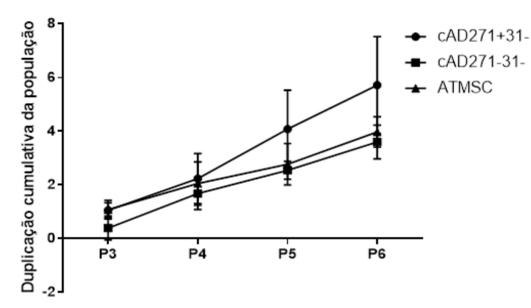


Figura 7: Cinética de cultivo de ATMSC, células AD271+31- e células AD271-31-. Gráfico da duplicação populacional cumulativa (n=3; *p<0,05 entre cAD271+31- e cAD271-31-) durante as passagens 3 e 6 de cultivo celular.

Conclusões:

Neste trabalho observou-se que o isolamento imunomagnético positivo para CD271 e negativo para CD31 forneceu uma população celular mais homogênea comparada as ATMSC. As células AD271+31- compreendem uma rara população de MSC, que mostraram-se positivas para marcadores de pericito CD271 e NG2, e não apresentaram CD146 na superfície celular. Quando cultivadas, as células AD271+31- apresentaram perfil de marcadores de superfície similar a ATMSC e células AD271-31-. Além disso, as células cAD271+31- apresentaram maior potencial de proliferação em comparação a células cAD271-31-. Células cAD271+31- mostraram tendência a serem mais eficientes na formação de colônias.

Referências Bibliográficas:

- Álvarez-Viejo et al. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells*. 2015; 7:470-6.
- Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 174:249-82.
- da Silva Meirelles L, et al. Mesenchymal stem cells and their relationship to pericytes. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016; 21:130-56.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26:2287-99.
- da Silva Meirelles L, et al. Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile. *Stem Cells Dev*. 2015;24:2822-40.
- Mabuchi Y, et al. LNGFR(+)/THY-1(+)/VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013; 1:152-65.