

ESTUDOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Gabriela da Silva Peters¹, Bruno Corrêa Bellagamba¹, Patrícia Bencke Grudzinski¹, Pedro Bins Ely², Lindolfo da Silva Meirelles¹,

¹Laboratório de Células-tronco e Engenharia de Tecidos, PGBioSaúde/ULBRA, Canoas, RS

²Irmadade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS

Contatos: gabriela.peters@gmail.com; brunobellagamba@gmail.com; paty_grud@hotmail.com; pedrobinsely@terra.com.br; lindolfomeirelles@gmail.com;

INTRODUÇÃO:

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são encontradas em quase todos os órgãos e tecidos pós-natais por estarem associadas aos vasos sanguíneos¹. As paredes internas dos vasos sanguíneos são formadas por células endoteliais (ECs) e a sua volta há a participação de pericitos. Os pericitos são células que estabilizam os vasos sanguíneos². Pericitos também exercem importantes funções na angiogênese e na síntese de moléculas bioativas, como os fatores de crescimento de diversos tecidos e células³. A angiogênese foi estabelecida como o brotamento de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais diferenciadas de um vaso pré-existente⁴. Sabe-se que as ECs isoladamente têm a capacidade de estimular angiogênese⁵. As células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas como agentes terapêuticos em diversos tipos de lesões e doenças de nosso organismo e, por isso, são de grande importância para a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos⁶.

OBJETIVO:

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. MSCs e ECs tiveram seus potenciais adipogênico e osteogênico testados, e suas cinéticas de cultura analisadas.

METODOLOGIA:

Foram utilizadas MSCs de tecido adiposo humano (hMSCs) da região abdominal obtido durante lipoaspiração em pacientes da Irmadade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, sendo o isolamento de MSCs realizado por digestão enzimática do tecido adiposo. Como células endoteliais, foram utilizadas células derivadas de hemangioendotelioma de camundongo (EOMA). As hMSCs e células EOMA, foram cultivadas em atmosfera umidificada a 37°C e com teor de 5% de CO₂, aderidas ao plástico com meio de cultura Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM), suplementado com ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazin-1-etanol-sulfônico (HEPES), 10% de soro fetal bovino e antibióticos. O Cocultivo entre MSC e EC foi realizado utilizando um conjunto de proteínas de matriz extracelular com fatores de crescimento e sem fatores de crescimento.

RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO:

Observamos, nos experimentos 1 e 2 de cinética de cultivo das EOMA, houve uma proliferação de, respectivamente, 0,691 e 0,635 duplicações por dia e nas hMSCs foi constatado 0,127 e 0,158 duplicações por dia, respectivamente, no doador 1 e no 2.

A diferenciação adipogênica das hMSCs foi confirmada nos doadores 1 e 2 (Figura 1), e a diferenciação osteogênica foi observada apenas no doador 1 (Figura 2). Nas células EOMA não houve diferenciação adipogênica e osteogênica.

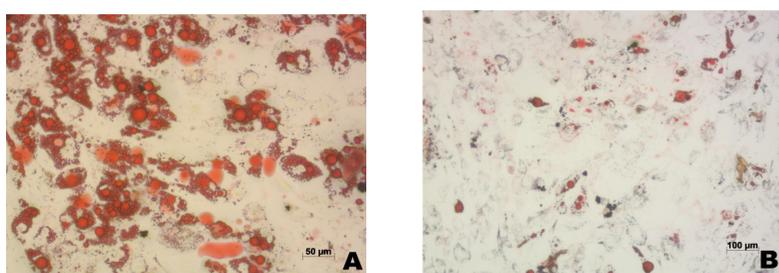


Figura 1: hMSCs em cultivo apropriado para diferenciação adipogênica, coradas após 15 dias com solução de Oil Red. Pode-se observar a capacidade de especialização das células que formaram vacúolos para suporte de gordura. As células diferenciadas dos doadores 1 e 2 foram coradas e visualizadas em microscópio invertido sem contraste de fase. A (doador 1 em aumento de 20x) e B (doador 2 em aumento de 10x).

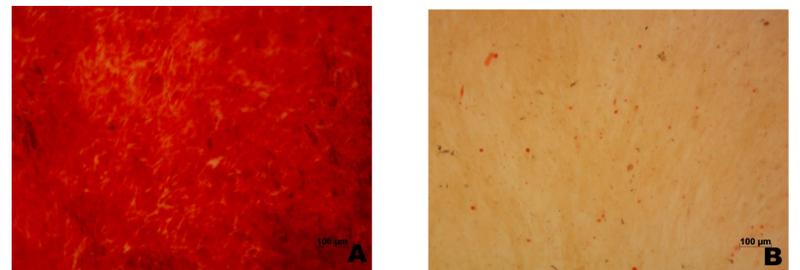


Figura 2: hMSCs submetidas a cultivo apropriado para diferenciação osteogênica e coradas após o 21º dia com solução de Alizarin Red S. Procurou-se observar a formação de matriz extracelular mineralizada (A), em microscópio invertido, sem contraste de fase e aumento de 10x. A (doador 1) e B (doador 2).

No cocultivo, constatamos que nos poços com proteína de matriz extracelular sem fatores de crescimento não ocorreram grandes mudanças, diferente de poços que possuíam proteína de matriz extracelular com fatores de crescimento. Estes mostraram um comportamento inesperado, formando algumas estruturas diferentes nos poços apenas com EOMA (Figura 3) e poços com cocultivo de EOMAs+hMSCs (Figura 4).

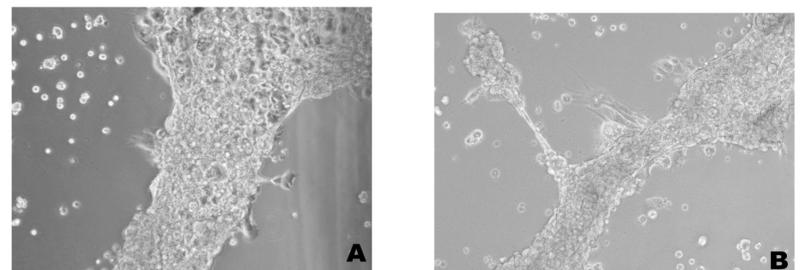


Figura 3: Poços apenas com EOMA, cultivadas em meio DMEM com 2% de SFB, contendo Matrigel com fatores de crescimento. Visualizadas após 24h em microscópio invertido, com contraste de fase e aumento de 10x. A (poço 5) e B (poço 6).

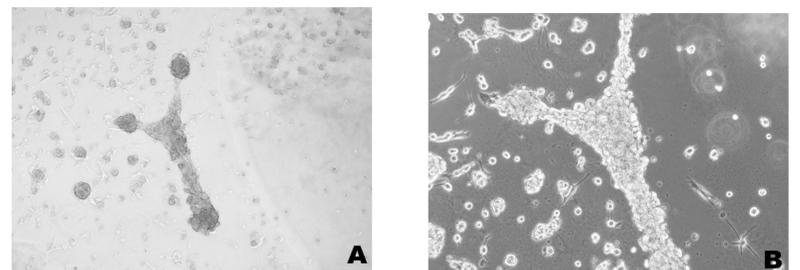


Figura 4: Poços com EOMAs + hMSCs, cultivadas em meio DMEM com 2% de SFB, contendo Matrigel com fatores de crescimento. As culturas foram visualizadas após 24h em microscópio invertido, com contraste de fase e aumentos de A (5x) e B (10x).

CONCLUSÕES:

Resultados comprovaram a diferenciação adipogênica e osteogênica das hMSCs, não podendo ser observadas diferenciações nas células EOMA. Neste estudo obtivemos diferentes resultados quando submetemos células mesenquimais e endoteliais ao cocultivo em proteína de matriz extracelular com ou sem fatores de crescimento. Não se pode afirmar com clareza a ocorrência da formação de túbulos semelhantes a estruturas de vasos sanguíneos nesses experimentos. No entanto, ficou claro que as hMSCs influenciaram o comportamento das células EOMA durante o cocultivo, o que levou à formação de estruturas que podem corresponder a rudimentos de vasos sanguíneos, o que não foi confirmado neste trabalho. As estruturas encontradas devem passar por um estudo mais aprofundado para que se possa esclarecer e determinar as causas desses resultados.

BIBLIOGRAFIA:

- Meirelles L; Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci., v. 119, p. 2204-13, 2006.
- Meirelles L, Caplan AI, Nardi, NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. J Stem Cells, v. 26, n. 9, p. 2287-99, 2008.
- Appaix, F. et al. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain? J Stem Cells, v. 6, n. 2, p. 134-14, 2014.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res. 2001;49:507-21
- Chekanov V, Akhtar M, Tchekanov G, et al. Transplantation of autologous endothelial cells induces angiogenesis. Pacing Clin Electrophysiol 2003;26:496-9.
- García-Gomez, I. et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. Expert OpinBiolTher., v. 10, n. 10, p. 1453-68, 2010.