

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADA DE GORDURA VISCERAL DE LEITÃO

Ricardo Augusto Neves Forner¹ e Ana Paula Almeida Bastos²

¹Graduando em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC, ricardoformer@gmail.com.

²Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves.

Palavras-chave: imunofenotipagem, imunomodulação, tolerância, suíno.

INTRODUÇÃO

Células-tronco são definidas pelo seu fenótipo indiferenciado, sua elevada capacidade proliferativa, sua capacidade de auto-renovação e seu potencial de diferenciação. Tais células podem ser classificadas em pluripotentes ou multipotentes (5,6). As CT pluripotentes são de origem embrionária e podem dar origem a qualquer fenótipo celular adulto. As CT multipotentes, por sua vez, se encontram praticamente em todos os tecidos adultos, possuem uma capacidade limitada de diferenciação e participam da homeostase e do processo de regeneração tecidual. Entre os tecidos que albergam CT multipotentes, a gordura é o mais estudado, como fonte quanto de células tronco mesenquimais (CTM) (3). Para serem consideradas CTMs as células precisam apresentar aderência seletiva a plástico e se diferenciar *in vitro* em adipócitos, osteoblastos e condrócitos em resposta a estímulos adequados. As CTMs não possuem um marcador específico que permita sua identificação e seu consequente isolamento. Nesse contexto, uma gama ampla de marcadores positivos e negativos é utilizada no âmbito científico. Um número cada vez maior de evidências vem demonstrando que as CTMs possuem capacidade de modular o sistema imunológico, podendo contribuir para a manutenção de tolerância a transplantes, evasão tumoral e tolerância materno-fetal (2,4).

MATERIAL E MÉTODOS

As CTMs são isoladas com base em sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão, sem perda de sua capacidade multipotencial, em meio de cultivo pobre em glicose, mas com altas concentrações de aminoácidos e proteínas (soro fetal bovino- FBS), sem a necessidade de citocinas. O tecido adiposo branco foi removido da região visceral de dois leitões, sob condições estéreis. Em seguida, o tecido foi digerido mecânica e enzimaticamente numa solução contendo colagenase tipo 1A. O tecido adiposo digerido foi ressuspenso em meio de cultura DMEM-low completo. Durante os 3 d consecutivos à extração, o meio de cultura foi trocado a cada 24 h. Empregamos a técnica de citometria de fluxo (Fluorescência Activated Cell Sorting- FACS) para caracterizar as CTM quanto a seu tamanho (FSC), granulocidade (SSC) e expressão de antígenos específicos. As CTMs de terceira passagem foram incubadas com os seguintes anticorpos: anti CD29-FITC (BD-Pharmingen), anti CD31-PE (BD-Pharmingen), anti CD90-PerCP (BD-Pharmingen), anti CD73-PE (BD-Pharmingen), anti CD45-PECy5 (BD-Pharmingen), anti Sca-1-PE (BD-Pharmingen), anti CD44-FITC (BD-Pharmingen), anti CD105-PECy7 (BioLegend) e os controles isotípicos correspondentes (BD-Pharmingen e BioLegend). Os controles isotípicos foram escolhidos de acordo com cada anticorpo e os parâmetros utilizados para a escolha basearam-se na espécie, no isotipo de origem do anticorpo e no fluorocromo conjugado. Um passo fundamental na caracterização de CTMs é demonstrar sua multi-potencialidade. Para tanto, as CTMs foram co-cultivadas em meio adipogênico e osteogênico. A diferenciação foi confirmada com coloração específica de *Oil red O* e *Alizarina red S* para adipócito e osteócitos, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse projeto, a imunofenotipagem das CTMs do tecido adiposo encontra-se em fase de padronização; diferentes painéis estão sendo testados. Em nossas avaliações iniciais, as CTMs foram analisadas quanto à expressão de CD29, CD90, CD73, CD31 e CD45 (Figura 1). Utilizamos como controle negativo as CTMs na ausência de qualquer anticorpo. A maioria das células expressou CD29 e CD90 (acima de 90%). Interessantemente, a expressão de CD73 foi baixa (5%). O marcador CD45 esteve presente numa frequência baixa nas populações avaliadas, indicando que as culturas não apresentavam contaminação significativa por células de linhagem hematopoiética. A expressão do marcador endotelial CD31, por outro lado, mostrou-se um pouco acima do esperado, foi de 15%. Resultados similares foram relatados por outro grupo de pesquisa que trabalhou com CTMs de tecido adiposo inguinal de humanos e camundongos, e compararam a expressão de diversos marcadores entre essas duas espécies. Os autores mostraram diferenças estatisticamente significantes entre células humanas e de camundongo quanto à expressão de CD31 e CD73. As CTMs de camundongo mostraram cerca de 20% de positividade para CD31, enquanto em células humanas este valor foi inferior a 2%. Para o marcador CD73, observou-se cerca de 80% e 15% de células positivas para humano e camundongo, respectivamente (1). Como vimos, dada a ausência de marcadores específicos, as CTMs podem incorporar diferentes populações celulares, potencialmente variáveis em suas características fenotípicas e de crescimento. Além disso, diversos fatores como métodos de isolamento, variações nos métodos de cultura, estágios de diferenciação das células e idade do doador também podem explicar variações na expressão de proteínas/marcadores específicos encontradas em diferentes estudos.

Conduzimos experimentos de diferenciação das CTMs *in vitro* em adipócitos e osteócitos. Na diferenciação adipogênica visualizamos vacúolos lipídicos em grande quantidade no citoplasma das células. Em contrapartida, o controle negativo co-cultivado com meio padrão não apresentou marcação citoplasmática. Na diferenciação osteogênica, por sua vez, foi observado matriz celular rica em cálcio que foi visualizada após coloração específica de Alizarina nas CTMs co-cultivadas com meio de diferenciação osteogênico. Alterações morfológicas de retração citoplasmática e aumento da granulidade também foram observadas nessas células. As CTMs co-cultivadas com meio padrão, por seu turno, não apresentaram alterações morfológicas nem marcação característica de osteoblastos (Figura 2).

CONCLUSÕES

Como vimos, dada a ausência de marcadores específicos, as CTMs podem incorporar diferentes populações celulares, potencialmente variáveis em suas características fenotípicas e de crescimento. Além disso, diversos fatores como métodos de isolamento, variações nos métodos de cultura, estágios de diferenciação das células e idade do doador também podem explicar variações na expressão de proteínas/marcadores específicos encontradas. Nossos experimentos demonstram que as células com as quais estamos trabalhando são capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos maduros quando estimuladas quimicamente, validando em caráter inicial nossas amostras celulares. Estudos complementares com mais marcadores de superfície devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

1. Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, dos Santos-Junior GR, Saint-Clair D, Bajgelman MC, et al. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. *Stem Cells Dev.* 2011 Apr;20(4):661-70.
2. Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* v.1106, p.272-8, 2007.
3. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* v.3, p.393-403, 1970.
4. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't Review].v.110, p.3499-506, 2007.
5. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* [Review]. v.287, p.1442-6, 2000.
6. Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, et al. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nature genetics.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. v.24, p.75-8, 2000

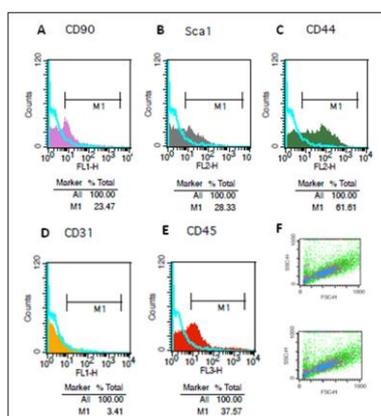


Figura 1. Imunofenotipagem das células tronco mesenquimais de tecido adiposo da região visceral. Histogramas representativos da expressão antigênica dos marcadores A) CD29, B) CD90, C) CD73, D) CD31, E) CD45 e F) *Dot plot* do tamanho celular (FSC) versus granulidade (SSC). Em todos os histogramas a linha azul clara representa o controle negativo e o parâmetro M1 representa a porcentagem de células que expressam o marcador.

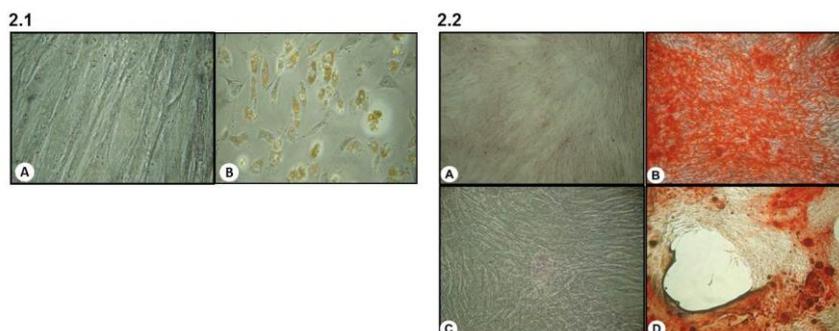


Figura 2. Diferenciação das CTMs da gordura visceral; 2.1 Diferenciação adipogênica; 2.2. Diferenciação osteogênica.