

## ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Felipe de Almeida Narciso<sup>1</sup>  
Bruno Corrêa Bellagamba<sup>2</sup>  
Pedro Bins Ely<sup>3</sup>  
Lindolfo da Silva Meirelles<sup>4</sup>

### RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células-tronco multipotentes capazes de se autorrenovarem e se diferenciarem em diversos tipos celulares mesenquimais. As CTMs encontram-se em quase todos os tecidos e órgãos pós-natais devido a sua associação com as células endoteliais (CEs) nos vasos sanguíneos, e podem agir no reparo de lesões no organismo. Os objetivos deste estudo foram analisar as interações entre CTMs e CEs *in vitro* e, também, investigar alterações fenotípicas durante o cocultivo dessas células, em busca de conhecimentos que possam contribuir para novas aplicações de CTMs na engenharia de tecidos e, por extensão na prática clínica. Neste trabalho, foram utilizadas CTMs de tecido adiposo humano e uma linhagem de células endoteliais derivada de hemangioendotelioma de camundongos (EOMA). Quando cultivadas em contato com CTMs, as células EOMA formaram estruturas semelhantes a capilares sanguíneos. Essas estruturas não se formaram durante o cultivo isolado dessas células. Esse resultado demonstra a importância da interação entre as CTMs e as CEs na angiogênese.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais, células endoteliais, EOMA, pericitos, medicina regenerativa.

### ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells able to self-renew and to differentiate into various mesenchymal cell types. MSCs are found in almost all postnatal tissues and organs owing to their association with endothelial cells (ECs) in blood vessels, and they can act to repair injuries in the body. The objectives of this study were to analyze the interactions between MSCs and ECs *in vitro* and, also, investigate phenotypic changes during coculture of these cells, in search of knowledge that may contribute to new applications of MSCs in tissue engineering and, by extension, in clinical practice. In this work, MSCs from human adipose tissue and an endothelial cell line derived from mouse hemangioendothelioma (EOMA) were used. When cultured in contact with MSCs, EOMA cells formed structures similar to blood capillaries. These structures did not

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

<sup>2</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

<sup>3</sup> Professor do Curso de Medicina/UFCSA e Chefe do Serviço de Cirurgia Plástica da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

<sup>4</sup> Professor – Orientador curso de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde /ULBRA ( [lindolfomeirelles@ulbra.edu.br](mailto:lindolfomeirelles@ulbra.edu.br) )

form when these cells were cultured alone. This result demonstrates the importance of the interaction between MSCs and ECs in angiogenesis.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, endothelial cells, EOMA, pericytes, regenerative medicine.

## INTRODUÇÃO

As células-tronco (CTs) são todas aquelas que possuem capacidade de autorrenovação e, ainda, de originar pelo menos uma célula em estágio mais avançado de diferenciação. As CTs são classificadas como células multipotentes ou células-tronco do adulto (CTAs) que possuem limitações de diferenciação celular, e células-tronco embrionárias ou totipotentes, que podem originar todos os tipos celulares do organismo adulto.

Dentre as CTAs, um dos tipos de CTs que vem sendo cada vez mais útil para pesquisas são as células-tronco mesenquimais (CTMs), que podem derivar de diversas fontes do organismo, como a medula óssea, o cordão umbilical e o tecido adiposo (YARAK; OKAMOTO, 2010). A associação das CTMs aos vasos sanguíneos faz com que estas estejam presentes em quase todos os tecidos e órgãos pós-natais (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006). A presença das CTMs nos vasos sanguíneos deve-se a sua origem a partir dos pericitos (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

Os pericitos são células que são encontradas em torno das células endoteliais (CEs) nos vasos sanguíneos, e que contribuem para a formação, manutenção e estabilização destes (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Pericitos também exercem importantes funções na angiogênese e na síntese de moléculas bioativas, como os fatores de crescimento de diversos tecidos e células (APPAIX et al., 2014).

Quando há uma lesão, os pericitos dão origem a CTMs que poderão participar do reparo tecidual (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008; CAPLAN, 2008). As CTMs têm um importante papel na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos por agirem de forma terapêutica em diversas lesões e patologias do organismo humano (GARCIA-GOMEZ et al; 2010). A angiogênese necessária para o reparo tecidual de tecidos vascularizados, por exemplo, é estimulada por CTMs derivadas de tecido adiposo (LISIECKI et al., 2014).

O presente estudo teve como principais objetivos analisar as interações entre CTMs e ECs, bem como possíveis alterações no fenotípicas nessas células, durante o cocultivo delas *in vitro*. Através deste estudo buscamos conhecimentos que possam contribuir para novas aplicações de CTMs na engenharia de tecidos e, por extensão na prática clínica.

## METODOLOGIA

Durante este estudo foram usadas CTMs humanas e células EOMA. As células EOMA são uma linhagem de células derivadas de hemangioendotelioma de camundongo, e sua utilização se dá porque essas células mantêm as propriedades e características de CEs microvasculares *in vitro* (OBESO; WEBER; AUERBACH, 1990). As CTMs e as EOMA

foram mantidas em garrafas de cultura (TPP) em uma incubadora a uma temperatura de 37°C em uma atmosfera umidificada com teor de 5% de CO<sub>2</sub>.

Os reagentes utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo – SP), com exceção feita àqueles cujos fornecedores são especificados. O isolamento de CTMs humanas foi feito a partir de 30 mL de tecido adiposo humano da região abdominal obtido durante lipoaspirações em pacientes da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O material foi coletado após obtenção prévia de autorização do doador, que assinou um termo de consentimento livre e esclarecido. Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa em seres humanos da ISCMPA e da ULBRA (número CAAE 11903713.7.0000.5335).

O tecido adiposo que foi aspirado passou duas vezes por lavagem com solução de Hank e depois seguiu para a digestão com collagenase tipo I por 40 a 50 minutos em tubo de centrifuga de 50 mL; esta enzima atua mais efetivamente durante a digestão de tecidos por conter outras enzimas agregadas a ela (LADEIRA et al., 2012).

Depois que o tecido foi digerido, no sobrenadante do tubo encontramos tecido adiposo e na fase inferior do tubo, no *pellet* celular, visualizou-se a fração estromal vascular que concentra uma grande quantidade de células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTAs). Quando a fração estromal é cultivada, culturas de CTMs são estabelecidas (ZUK et al., 2001).

Além de cultivo convencional das CTMs e das células EOMA; realizou-se um cocultivo dessas células. O meio utilizado para as culturas foi o meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), 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. Houve a utilização de garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> e de 75 cm<sup>2</sup>. A troca do meio de cultura das garrafas ocorreu a cada 72 horas.

Os repiques da população celular das garrafas foram realizados com aplicação de solução de Hank suplementada com 0,5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que promove uma lavagem na garrafa. Para desprendimento das células, foi utilizada a enzima tripsina, uma protease que realiza a hidrólise de ligações peptídicas com cadeia lateral carregada positivamente. Na sequência, a tripsina foi inativada pela adição de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram removidas da garrafa onde estavam e colocadas em tubo de centrifuga de 15 mL para centrifugação e posterior subcultura. A quantidade de cada uma das soluções utilizadas durante o repique da população dependeu do tamanho da garrafa de cultura celular conforme descrição na tabela 1. A quantidade dos compostos usados no repique celular adicionados à garrafa também dependeu do tamanho da população celular que estava sendo cultivada.

O cálculo utilizado para contabilização do número de duplicações da população (DP) celular das garrafas foi  $DP = [\text{Log}(\text{número final de células}) - \text{Log}(\text{número inicial de células})] / \text{Log}2$ . Para saber o tempo de duplicação em dias, o número de dias em cultura foi dividido pelo número de duplicações da população. A contagem das células foi feita em uma câmara de Neubauer. Para avaliação da viabilidade celular durante a contagem, 10

$\mu\text{L}$  da amostra de células foram combinados com 10  $\mu\text{L}$  de corante Azul Tripán. Células que incorporaram o corante foram consideradas não viáveis.

**Tabela 1.** Procedimentos realizados durante os repiques de população celular de CTMs e células EOMA em garrafas de 25  $\text{cm}^2$  e 75  $\text{cm}^2$ .

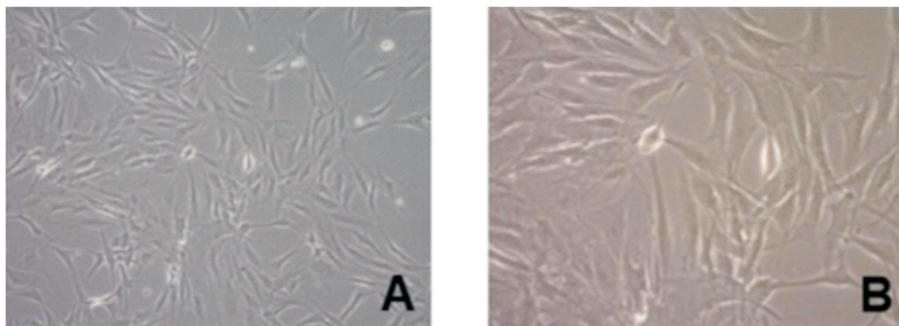
	ETAPA	PROCEDIMENTO	TEMPO
Garrafa de 25 $\text{cm}^2$	1	Retirada do meio da garrafa e adição de 3 mL da solução de Hank/EDTA.	5 a 7 minutos de incubação.
	2	Retirada da solução de Hank com 0,5 mM de EDTA e aplicação de 2 mL de tripsina 0,025% em solução de Hank com 0,5 mM de EDTA sobre o conteúdo da garrafa.	5 a 7 minutos de incubação a 37°C.
	3	Acréscimo de 4 mL de DMEM com 10% de soro fetal bovino à tripsina na garrafa e transferência para tubo de 15 mL para centrifugação.	10 minutos de centrifugação.
Garrafa de 75 $\text{cm}^2$	1	Retirada do meio da garrafa e adição de 6 mL da solução de Hank/EDTA.	5 a 7 minutos de incubação.
	2	Retirada da solução de Hank com 0,5 mM de EDTA e aplicação de 4 mL de tripsina 0,025% em solução de Hank com 0,5 mM de EDTA sobre o conteúdo da garrafa.	5 a 7 minutos de incubação a 37°C.
	3	Acréscimo de 6 mL de DMEM com 10% de soro fetal bovino à tripsina na garrafa e transferência para tubo de 15 mL para centrifugação.	10 minutos de centrifugação.

Antes do cocultivo, que teve duração de 15 dias, as células EOMA foram marcadas com o corante fluorescente CM-Dil (Molecular Probes, Life Technologies, São Paulo - SP). Esse corante exibe coloração vermelha quando excitado por luz verde em um microscópio de fluorescência. As células EOMA foram coradas antes de entrarem em contato com as CTMs para que pudessem ser visualizadas por microscopia de fluorescência. A microscopia de fluorescência foi realizada em um microscópio de fluorescência invertido modelo Axio Vert. A1 (Zeiss, Alemanha).

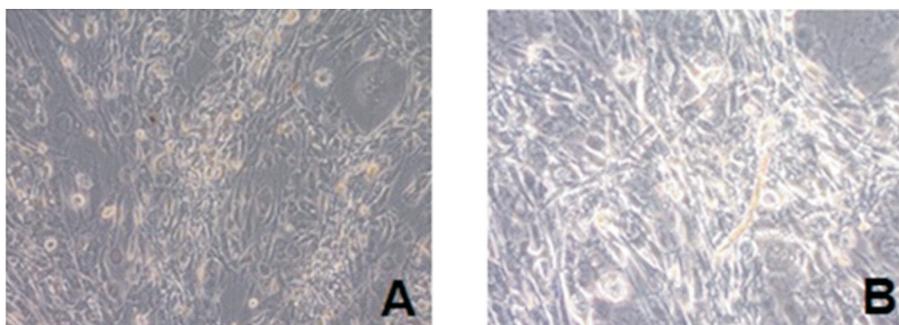
## RESULTADOS

As CTMs apresentaram morfologia característica durante seu cultivo, conforme a figura 1. A população celular se duplicou a cada 72 horas, a uma velocidade de 0,334 duplicações da população inicial por dia. Além disso, o cocultivo das CTMs com as células EOMA deu origem a estruturas semelhantes a capilares sanguíneos em meio a aglomerados de células após 3 dias de cultura (Figura 2).

**Figura 1:** CTMs em cultivo convencional, em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, visualizadas com contraste de fase em microscópio invertido nos aumentos de (A) 100x e (B) 200x, apresentando morfologia característica.

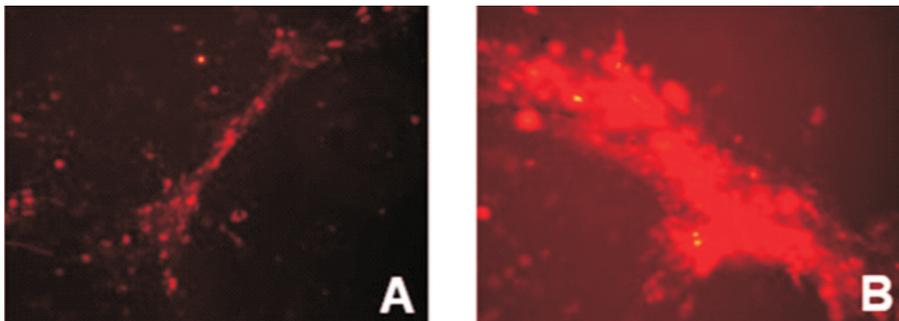


**Figura 2:** CTMs e células EOMA após 3 dias em cocultivo, em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, visualizadas em (A) 100x e (B) 200x com contraste de fase em microscópio invertido.



O comportamento das células EOMA nos cocultivos pôde ser acompanhado por observação das culturas em microscópio de fluorescência, uma vez que essas células foram marcadas com o corante fluorescente CM-DiI imediatamente antes de serem colocadas em contato com as CTMs. A partir de três dias de cocultivo, as células EOMA formaram estruturas semelhantes a capilares sanguíneos. Essas estruturas mantiveram-se durante os 15 dias de cocultivo, conforme exibido na figura 3. Essa análise indicou que foi a interação entre as CTMs e as células EOMA que possibilitou a formação de estruturas semelhantes a capilares sanguíneos, uma vez que CTMs e EOMA cultivadas separadamente não formaram essas estruturas.

**Figura 3:** Estruturas formadas por células EOMA após 15 dias de cocultivo com CTMs, em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, visualizadas em (A) 100x e (B) 200x em microscópio invertido com detecção de fluorescência. Note estruturas semelhantes a capilares sanguíneos marcadas em vermelho devido ao corante aplicado nas células EOMA anteriormente ao cocultivo.



## DISCUSSÃO

As CTMs apresentaram características morfológicas esperadas durante este estudo. Nas condições de cultivo utilizadas, a duplicação da população das CTMs em cultura ocorreu em 72h. Outras características das CTMs incluem a diferenciação celular (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008); ensaios de diferenciação das CTMs não foram realizados neste estudo visto que as culturas foram obtidas utilizando-se um protocolo rotineiramente utilizado no laboratório e que resulta no estabelecimento de populações de CTMs. Neste sentido, o isolamento de CTMs pôde ser feito a partir de tecido adiposo por este concentrar CTDTAs no *pellet* celular conforme descrito por Zuttion et al. (2013).

Há evidência de que os pericitos originam as CTMs (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). A formação de estruturas semelhantes a capilares confirmou que CTMs interagem ativamente com as células endoteliais, que neste estudo foram representadas pelas células EOMA. Essa associação observada *in vitro* vai ao encontro da hipótese segundo a qual CTMs encontram-se associadas aos vasos sanguíneos no organismo, o que faz com que elas estejam presentes em quase todos os órgãos e tecidos pós-natais (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

A formação das estruturas semelhantes a capilares observada neste estudo sugere que algumas CTMs podem ter se tornado pericitos neste experimento. Anteriormente a este trabalho, demonstrou-se que células EOMA formam estruturas semelhantes a capilares quando cultivadas sobre matriz extracelular representativa da membrana basal de vasos sanguíneos (OBESO; WEBER; AUERBACH, 1990). Neste estudo, infere-se que as CTMs proveram matriz extracelular e biomoléculas que permitiram a formação de estruturas semelhantes a capilares pelas células EOMA.

## CONCLUSÃO

A medicina regenerativa busca, cada vez mais, maneiras de utilizarem-se CTAs no reparo de lesões teciduais. Neste estudo, estruturas semelhantes a capilares sanguíneos

foram formadas pelas células EOMA devido ao contato com as CTMs, o que demonstra a importância da interação entre CTMs e CEs na angiogênese. Sendo assim, confirma-se que as interações entre as CTMs e as CEs podem trazer novas perspectivas *in vivo* para a medicina regenerativa.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à ULBRA, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. F.A.N. recebeu uma bolsa PROBIC/FAPERGS durante sua participação neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- APPAIX, F. et al. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain? **J Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 134-140, 2014.
- CAPLAN, A. I. All MSCs are pericytes? **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 229-230, 2008.
- GARCIA-GOMEZ, I. et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. **Expert Opin Biol Ther**, v. 10, n. 10, p. 1453-1468, 2010.
- LADEIRA, P. R. S. et al. Culture of adipose-derived stem cells: a critical analysis. **RevMed**, São Paulo, v. 91, n. 4, p. 246-52, 2012.
- LISIECKI, J. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from ventral hernia repair patients demonstrated decreased vasculogenesis. **Biomed Res Int**, v. 2014, Article ID 983715, 2014.
- MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.
- MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **J Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.
- MENDEL, T. A. et al. Pericytes Derived from Adipose-Derived Stem Cells Protect against Retinal Vasculopathy. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e65691, 2013.
- OBESO, J.; WEBER, J.; AUERBACH, R. A hemangioendothelioma-derived cell line: its use as a model for the study of endothelial cell biology. **Lab Invest**, v. 63, n. 2, p. 259-269, 1990.
- YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.
- ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.
- ZUTTON, M. S. S. R. et al. Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. **Rev Bras Cardiol Invasiva**, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2013.