RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/01/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
BOVINOS

TATICIA LIEH IKEDA

Botucatu – SP

Janeiro, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
BOVINOS

TATICIA LIEH IKEDA

Dissertação apresentada junto ao
programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda da Cruz
Landim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ikeda, Taticia Lieh.

Isolamento e caracterização de células-tronco
mesenquimais derivadas do tecido adiposo de bovinos /
Taticia Lieh Ikeda. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50500007

1. Bovino. 2. Vaca. 3. Expressão gênica. 4. Tecido
adiposo. 5. Células-tronco.

Palavras-chave: Expressão gênica; Marcadores de superfície
celular; Potencial de diferenciação; Vaca.

Nome do autor: Taticia Lih Ikeda

Título: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE DE BOVINOS

Data: 26 de janeiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Edson Lo Turco

Membro

Departamento de Urologia

Universidade Federal de São Paulo – São Paulo

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim pela confiança e suporte dado durante todo o curso de mestrado, pela disponibilidade em me ajudar quando e onde eu estivesse e pelo apoio dado em todas as minhas decisões profissionais.

A todos os integrantes, estagiários e colaboradores do Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular que me acompanharam durante meu mestrado e que contribuíram de alguma forma com o meu projeto, seja com protocolos, reagentes ou “apoio moral”. Em especial, gostaria de agradecer a Amanda, Bianca, Isadora, Loreta e Midyan que além da ajuda técnica me ofereceram a amizade.

A Carol “Guapa”, que merece um parágrafo a parte, pela enorme ajuda durante os meus experimentos e com os (vários) documentos que precisavam ser entregues na Seção de Pós-graduação. Mas, acima de tudo, gostaria de agradecer pelo ombro amigo sempre à disposição.

Ao Prof. Dr. João Pessoa, Camila e Jaqueline pelos primeiros ensinamentos sobre PCR.

Ao Prof. Dr. João Pesquero por disponibilizar o laboratório para que eu realizasse meus experimentos de expressão gênica. Agradeço ao Giscard e a Paola pela grande ajuda durante essa etapa.

A Fazenda Marino por disponibilizar os animais utilizados nesse estudo.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Biociências por todos os ensinamentos que complementaram minha formação.

A todos os funcionários da Seção de Pós-graduação e do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária que contribuíram de alguma forma com meu mestrado.

Ao Marcello pelas análises estatísticas, pela paciência e conselhos.

Aos membros da banca pela disponibilidade e inestimáveis recomendações.

A CNPq pelo apoio financeiro recebido durante o curso de mestrado.

A Camila, Ivy e Ana pela amizade e por terem sido ótimas companheiras de república. Ao Paulo por ter sido essa surpresa boa na minha vida. A todos meus amigos (novos e antigos) que de alguma forma tornaram essa jornada mais agradável.

Por fim, gostaria de agradecer minha família que, mesmo não entendendo direito o tema do meu mestrado, me apoiou de todas as formas possíveis.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência de oligonucleotídeos empregados na análise de qPCR

TABELA 2. Avaliação da eficiência de UFC-F. Número de UFC e valores de eficiência (%) estão descritos como média e desvio padrão

TABELA 3. Avaliação da eficiência de UFC-F de acordo com a morfologia. Valores descritos como média e desvio padrão

TABELA 4. Média e desvio padrão do perfil imunofenotípico das CTM-AD (%) nos momentos P0 e P2

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Delineamento experimental

FIGURA 2. Coleta de tecido adiposo subcutâneo

FIGURA 3. Fracionamento da amostra de tecido adiposo (A) para facilitar a digestão enzimática. (B) Amostra pós-fracionamento

FIGURA 4. Morfologia das ASC bovinas em cultivo primário: característica fibroblastóide das células com 72h (A) e 96h (B), no aumento de 100 X. Confluência de 80% obtida após aproximadamente 216h, no aumento de 100 X (C) e 200 X(D).

FIGURA 5. Avaliação morfológica das UFC-F coradas com cristal violeta. (A) Avaliação macroscópica. (B) Imagem microscópica representativa de colônias densas, no aumento de 40 X. (C) Imagem microscópica representativa de colônias dispersas, no aumento de 40 X.

FIGURA 6. Histograma representativo da citometria de fluxo dos marcadores CD44, MHC II, CD34 e vimentina nos momentos P0 e P2. Marcação positiva para CD44 em P0 (média de 86,6 % - A) e em P2 (média de 76,6 % - B). Marcação negativa para MHC II em P0 (média de 2,1 % - C) e em P2 (média 2,3 % -D). Baixa marcação de CD34 em P0 (média de 8,7 % - E) e em P2 (média de 1,8 % - F). Marcação positiva para vimentina em P2 (média de 82,48 % - G).

FIGURA 7. Diferenciação osteogênica, após 10 dias de cultivo, coradas com *Alizarin Red*: células mantidas em meio de cultivo (células não-induzidas), no aumento de 100 X (A) e 200X (B), e células mantidas em meio indutor apresentando deposição de cálcio corada em vermelho, no aumento de 100 X (C) e 200 X (D).

FIGURA 8. Diferenciação adipogênica, após 10 dias de cultivo, corada em *Oil Red*: células mantidas em meio de cultivo (células não-induzidas), no aumento de 200 X(A) e 400 X (B), e células mantidas em meio indutor apresentando

lipídios intracitoplasmáticos corados em vermelho, no aumento de 200 X (C) e 400 X.

FIGURA 9. Análise quantitativa da expressão relativa (em unidades arbitrárias – u.a.) dos genes colágeno tipo I (A), osteopontina (B) e PPAR- γ (C) das CTM-AD cultivadas em meio de diferenciação osteogênica e adipogênica. O RNA total das células foi obtido após 3 (D3) e 15 dias (D15) do início da indução da diferenciação. A expressão dos genes alvos foi normalizada com a expressão de GAPDH. As células não-induzidas (mantidas em meio de cultivo), nos respectivos tempos, foram utilizadas como amostra calibradora (valor = 1). Valores expressos em média e desvio padrão do parâmetro $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (n=6, em triplicata).

LISTA DE ABREVIATURAS

CTM - células-tronco mesenquimais

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

UFC-F - unidade formadora de colônia fibroblastóide

FVE- fração vascular do estroma

ISCT – do inglês *International Society of Cell Therapy* (Sociedade Internacional de Terapia Celular)

CTM-MO - células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

CTM-AD - células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

IFATS – do inglês *International Federation for Adipose Therapeutics and Science* (Federação Internacional de Pesquisa e Terapia com Tecido Adiposo)

TNF - fator de necrose tumoral

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

IGF - fator semelhante à insulina

EGF - fator de crescimento epidérmico

IL - interleucina

IFN - interferon

IDO - indoleamina 2,3 dioxigenase

NO - óxido nítrico

SCNT - transferência nuclear de células somáticas

PBS - solução tampão salina-fosfato

PPAR - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

OCN - osteocalcina

SSP1 - osteopontina

COL I - colágeno tipo 1

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

C/EBP - proteína estimuladora de ligação a CCAAT

SFB - soro fetal bovino

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Células-tronco	5
2.2 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	6
2.3 Medicina Regenerativa	9
2.4 CTM na espécie bovina	12
3 OBJETIVOS	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1 Local	15
4.2 Animais	15
4.3 Reagentes.....	15
4.4 Delineamento.....	15
4.5 Colheita de Material	16
4.6 Isolamento e Cultivo Celular	17
4.7 Avaliação de UFC-F.....	18
4.8 Passagens	19
4.9 Caracterização.....	19
4.10 Diferenciações osteogênica e adipogênica.....	20
4.10.1 Preparo de células e indução da diferenciação.....	20
4.10.2 Avaliação microscópica.....	21
4.10.3 Avaliação da expressão gênica.....	21
4.11 Análise estatística	23
5 RESULTADOS	24
5.1 Morfologia	24
5.2 Avaliação de UFC-F.....	25
5.3 Caracterização.....	26
5.4 Diferenciação osteogênica e adipogênica.....	28
5.4.1 Avaliação microscópica	28
5.4.2 Análise da expressão gênica.....	29

6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÃO.....	37
8	REFERÊNCIAS.....	38
9	TRABALHO CIENTÍFICO.....	47

IKEDA, T.L. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de bovinos. Botucatu, 2016. 54 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

As células-tronco mesenquimais (CTM) representam uma atrativa ferramenta para a medicina regenerativa, a engenharia de tecidos e a terapia celular. Na espécie bovina, as pesquisas sobre a caracterização de CTM ainda são raras, principalmente utilizando-se o tecido adiposo como fonte de obtenção. Com o objetivo de isolar e caracterizar CTM derivadas do tecido adiposo de bovinos, foram utilizadas amostras de seis vacas e isoladas CTM por meio de digestão enzimática e cultivo celular em monocamada. As células em primeira (P0) e terceira passagem (P3) foram, então, submetidas a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo. A diferenciação osteogênica e adipogênica foi avaliada microscopicamente após 10 dias de indução e por qPCR em tempo real após 3 e 15 dias de indução. Foram obtidas células fibroblastóides e aderentes ao plástico. Estas apresentaram, na citometria de fluxo, marcação positiva para CD44 (86,6 % em P0 e 76,6 % em P2) e vimentina (82,48 % em P2), baixa marcação de CD34 (8,7 % em P0 e 1,8 % em P2) e marcação negativa para MHC II (2,1 % em P0 e 2,3 % em P2). Na avaliação microscópica, todas as amostras responderam positivamente às diferenciações nas linhagens osteogênica e adipogênica, além de apresentarem expressão de osteopontina e colágeno tipo I e PPAR- γ , respectivamente, pelo qPCR em tempo real. Não foi observada a expressão de osteocalcina em nenhuma amostra submetida a indução osteogênica. Os resultados obtidos indicam o tecido adiposo de bovinos como uma fonte viável de CTM para medicina regenerativa e terapia celular.

Palavras-chave: vaca, marcadores de superfície celular, citometria de fluxo, potencial de diferenciação, expressão gênica

IKEDA, T.L. Isolation and characterization of bovine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. Botucatu, 2016. 54 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Mesenchymal stem cells (MSC) are an interesting tool for regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy. In bovine species, MSC are not well described. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize bovine MSC obtained from adipose tissue. Samples from six cows were used to isolate MSC by enzymatic digestion followed by monolayer culture. These cells were, then, submitted to immunophenotyping by flow cytometer at first (P0) and third (P2) passages. Osteogenic and adipogenic differentiation potential was evaluated microscopically after 10 days of induction and by Real Time qPCR after 3 and 15 days of induction. Cells showed plastic-adherent characteristic and fibroblastoid morphology. They expressed CD 34 (8,7 % at P0 e 1,8 % at P2), CD44 (86,6 % at P0 e 76,6 % at P2) and vimentin (82,48 % at P2) and did not express MHC II (2,1 % at P0 e 2,3 % at P2). All samples showed potential to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages and expressed osteopontin and collagen type I and PPAR- γ , respectively. Osteocalcin was not expressed in any sample. Our results shows the possibility of using bovine adipose tissue as a source of MSC for regenerative medicine and cell therapy.

Key words: cow, surface makers, flow cytometer, differentiation potential, gene expression

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco são consideradas uma grande promessa na terapia celular, medicina regenerativa e engenharia de tecidos (FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011). Essas células apresentam capacidade de autorrenovação e de diferenciação em outras linhagens celulares, sendo responsáveis por substituir células danificadas ou mortas (BUNNEL et. al, 2008; FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011). Além disso, as células-tronco secretam fatores parácrinos que ajudam na reparação de tecidos feridos (FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011) e sua propriedade imunomoduladora torna-as atrativas para o tratamento de doenças autoimunes e no auxílio contra a rejeição de tecidos e/ou órgãos transplantados (SENSEBÉ et al., 2010; SHI; LIU; WANG, 2011).

Atualmente, os mecanismos biológicos pelos quais as CTM atuam durante o processo inflamatório ou de reparação tecidual são foco de extensa pesquisa. O melhor conhecimento da biologia e do comportamento dessas células nas diversas espécies não apenas favorece seu uso como ferramenta terapêutica na medicina veterinária, como também representa uma importante etapa para testes pré-clínicos de distúrbios em humanos. Tradicionalmente, utiliza-se a espécie murina como modelo experimental, entretanto, o uso de animais de grande porte filogeneticamente mais próximos aos humanos tornou-se cada vez mais interessante (BERNARDO; PAGLIARA; LOCATELLI, 2012). O emprego desses animais torna-se atrativo principalmente em pesquisas de longa duração, pois, além de apresentarem similaridades em fisiologia e tamanho de órgãos com humanos, possuem uma expectativa de vida maior que os animais de laboratório tradicionalmente utilizados (PATTERSON-KANE; BECKER; RICH, 2012).

O bovino é um importante animal de produção e com alto impacto econômico. Problemas reprodutivos e musculoesqueléticos, como baixa fertilidade, mastite e doenças articulares, resultam em prejuízos na indústria leiteira e de carne (HERATH, et al., 2006; BARBOSA et al., 2014). Neste contexto, as CTM podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento dessas enfermidades, melhorando a produção e diminuindo o descarte de

animais. Além disso, as CTM podem ser empregadas para aumentar a eficiência de biotécnicas ligadas a reprodução animal como produção *in vitro* de embriões e transferência nuclear de células somáticas (SCNT – KUMAR et al., 2007).

Apesar de sua importância como modelo experimental *in vivo* e de ser uma promissora ferramenta terapêutica, pouco se conhece sobre as características biológicas das células-tronco na espécie bovina. Por esta razão, esse experimento teve como principal objetivo avaliar o comportamento das CTM bovinas provenientes do tecido adiposo, visando empregá-las futuramente no tratamento de distúrbios reprodutivos e musculoesqueléticos em bovinos, bem como utilizar essas células como modelo experimental para doenças de outros animais.