

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/09/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRANSCRIPTOMA E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
PROTEÔMICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO
TECIDO ADIPOSEO DE MINI-HORSES (*Equus ferus caballus*)

ALICE PEREIRA MACIEL

Botucatu - SP
Setembro 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRANSCRIPTOMA E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
PROTEÔMICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO
TECIDO ADIPOSEO DE MINI-HORSES (*Equus ferus caballus*)

ALICE PEREIRA MACIEL

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal (Área de concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Professora Dra. Fernanda da Cruz Landim

Botucatu - SP

Setembro 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Maciel, Alice Pereira.

Transcriptoma e caracterização do perfil proteômico de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de mini-horses (*Equus ferus caballus*) / Alice Pereira Maciel. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Técnicas de cultura de células. 2. Células - Diferenciação. 3. Equino. 4. Expressão gênica. 5. Terapia celular.

Palavras-chave: cultivo celular; diferenciação celular; equinos; expressão gênica; terapia celular.

Nome do Autor: Alice Pereira Maciel

Título: TRANSCRIPTOMA E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE MINI-HORSES (*Equus ferus caballus*)

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Drª. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla

Membro

Departamento de Parasitologia

IBB – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 30 de Setembro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe Maria Bernadete Pereira Costa Maciel, por todos os desafios e esforços para minha educação e por seu amor incondicional, aceitando as distâncias físicas.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Virgem Maria, por me sustentarem na fé durante minha vida.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A minha orientadora Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim, pela orientação, por toda confiança depositada, por todo ensinamento e por fazer todo o possível para realização desse trabalho.

Aos membros da banca, tanto de qualificação como de defesa, obrigada por aceitarem o convite e suas contribuições: Dra. Fabiana Ferreira, Dr. Paulo Ribolla e Dr. Samir Kadri.

Ao Prof. Dr. Paulo Ribolla por permitir o acesso ao seu laboratório, para realização do transcriptoma e aos doutores Samir Kadri e Diego Alonso por auxiliarem na sua realização.

Aos amigos do LANÇA: Laís Cintra, Ramona Bastos, Danielle Jaqueta, Maria Laura Lara, Gabriel Camargo e Ludmilla Janini pela parceria e amizade.

A Dra Isadora Arruda, pela amizade, por todo conhecimento transmitido sobre as células-tronco e funcionamento do laboratório, e por todas as vezes que retornou ao laboratório para auxiliar na execução desse trabalho. Aos amigos da pós-graduação e residentes: Barbara Sardela, Bruna Martins, Gabriela Picelli, Gabriel Barbosa,IVALDO Junior, Thais Cavaleiro e Viviane Cognomoto pela amizade, caronas e apoio.

A minha família, por tentar entender a distância a constante ausência, e permanecer sempre me apoiando.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

À Marina Landim-Alvarenga e a empresa OMICS por todo material fornecido.

“Dá-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir”.

São Tomás de Aquino

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	
1. Introdução.....	1
1.1 Objetivo geral.....	2
1.2 Objetivo específico.....	2
2. Revisão de literatura.....	3
2.1 Células-tronco.....	3
2.2 Células-tronco mesenquimais.....	4
2.3 Atividades imunomoduladoras.....	6
2.4 Equinos e mini-horses.....	7
3. Referências.....	9
CAPÍTULO II	10
Trabalho científico.....	11
CAPÍTULO III	45
Considerações finais.....	46

RESUMO

MACIEL, A. P. Transcriptoma e caracterização do perfil proteômico de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de mini-horses (*Equus ferus caballus*). Botucatu, 2019. p.62 dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

As células-tronco mesenquimais extraídas da medula óssea ou tecido adiposo são utilizadas em abordagens terapêuticas, em vista das suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e regenerativas. Estas células são consideradas uma nova alternativa para o tratamento de enfermidades em diversas espécies, incluindo as dos equinos. Dessa forma, com o intuito de investigar a possível utilização das células estromais de mini-horses em tratamentos de cavalos, nesse estudo foi realizada a colheita, isolamento, expansão, caracterização imunofenotípica e diferenciação em duas linhagens mesenquimais: osteogênica e adipogênica de células estromais de mini-horses (*Equus ferus caballus*), objetivando a formação de um banco celular. Foi ainda realizada a análise transcricional comparativa dessas células, com as células estromais oriundas de cavalos (*Equus caballus*), produzidas e caracterizadas nas mesmas condições. Os parâmetros analisados foram o perfil de genes relacionados à angiogênese, regulação negativa da proliferação de células T, regulação negativa da ativação de células T, proliferação negativa de linfócitos reguladores, regulação negativa da proliferação de células mononucleares, regulação negativa da adesão célula-célula de leucócitos, regulação negativa da proliferação de leucócitos, regulação negativa da adesão célula-leucócito, regulação negativa da ativação de linfócitos. Também foram pesquisados os principais genes *up* e *down* regulados comparando mini-horses aos cavalos. Para formação do banco celular foram realizadas avaliações que comprovaram as características de células estromais nas células obtidas dos mini-horses, a avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo demonstrou expressão alta dos marcadores CD90 ($99,83 \pm 0,28$) e esperada do CD105 ($38,66 \pm 18,47$) e expressão baixa dos marcadores CD34 ($3,55 \pm 1,14$) e MHC II ($4,21 \pm 2,03$). O potencial de diferenciação em linhagens adipogênicas *in vitro* foi observado

após o 14^o dia através da visualização da deposição de gotículas lipídicas no citoplasma, e a linhagem osteogênica foi identificada após o 21^o dia pela coloração positiva da matriz de cálcio extracelular. Ao final da avaliação transcricional, observamos um perfil de expressão gênica diferente entre os grupos, sugerindo que as diferenças entre os animais estudados se expande a mutação do gene Aggrecan que determina o nanismo. Apesar disso, os resultados indicam que as células estromais de mini-horse podem ser utilizadas como uma alternativa para o tratamento de lesões equinas com a vantagem de apresentarem uma maior expressão de genes relacionados à imunomodulação.

Palavras-chave: Cultivo celular, Diferenciação, Equinos, Gene, Terapia celular.

ABSTRACT

MACIEL, A. P. Transcriptome and protein profile characterization of mesenchymal stem cells from adipose tissue of mini horses (*Equus ferus caballus*). Botucatu, 2019. 62p. Thesis dissertation (Master degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University (Unesp).

Mesenchymal stem cells extracted from bone marrow or adipose tissue are used in therapeutic approaches in view of their anti-inflammatory, immunomodulatory and regenerative properties. These cells are considered a new alternative for the treatment of diseases in several species. In order to investigate the possible use of mini-horses stromal cells in horse treatments, in this study was performed the collection, isolation, expansion, immunophenotypic characterization and differentiation in two mesenchymal lines were performed: osteogenic and adipogenic stromal cell mini-horses (*Equus ferus caballus*), aiming the formation of a cellular bank. We also performed the comparative transcriptional analysis of these cells, with stromal cells from horses (*Equus caballus*), produced and characterized under the same conditions. The parameters analyzed were the profile of genes related to angiogenesis, negative regulation of T cell proliferation, negative regulation of T cell activation, negative proliferation of regulatory lymphocytes, negative regulation of mononuclear cell proliferation, negative regulation of cell-cell adhesion leukocytes, negative regulation of leukocyte proliferation, negative regulation of cell-leukocyte adhesion, negative regulation of lymphocyte activation. We also searched the top 10 genes up and down regulated comparing mini-horses to horses. For cell bank formation tests were performed that demonstrated the characteristics of stromal cells in the cells obtained from the mini-horses, the immunophenotypic evaluation by flow cytometry showed high CD90 (99.83 ± 0.28) and expected CD105 (38.66 ± 18.47) and low expression of the CD34 (3.55 ± 1.14) and MHC II (4.21 ± 2.03) markers. The potential for differentiation in in vitro adipogenic lines was observed after day 14

by visualization of the deposition of lipid droplets in the cytoplasm, and the osteogenic lineage was identified after 21 ° day by the positive staining of the extracellular calcium matrix. At the end of the transcriptional evaluation, we observed a different gene expression profile between the groups, suggesting that the differences between the studied animals expands the Aggrecan gene mutation that determines the dwarfism. However, the results strongly indicate that ASCs from mini-horses can be used as an alternative to treat horse's diseases, with the vantages of presenting a higher expression of immunomodulatory genes.

Key words: Cell culture, Cell therapy, Differentiation, Equines, Gene.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os mini-horses (*Equus ferus caballus*) são integrantes do grupo de equídeos que englobam os cavalos (*Equus caballus*) e, os asininos ou jumentos (*Equus asinus*) (LESCHONSKI; SERRA; MENANDRO, 2008), que recentemente vem ganhando notoriedade em exposições e haras devido a sua inclusão no mercado pet. Sua conformação, semelhante a um cavalo em miniatura ocorre por alteração genética, devido à espécie ser oriunda do cruzamento de equinos de diferentes raças, resultando em fêmeas com altura máxima de 0,98 m e machos 0,93 m, que mesmo apresentando um pequeno porte, são considerados como uma raça de tripla aptidão, com a vantagem, que quando comparados a equinos de porte regular, necessitam de menores espaços e, conseqüentemente menores custos de criação, sem perder a resistência e rusticidade. Tais atribuições auxiliam na representatividade da raça, com significativo crescimento no Brasil (Associação Brasileira dos Criadores de Mini Horse, 2006).

A participação dos equídeos na economia nacional é representada através do complexo do agronegócio dos cavalos, a qual passou por um grande crescimento nos últimos anos, voltado especialmente para o público urbano, tanto no lazer como no esporte. Este crescimento tem resultado em maiores cuidados e gastos, que incluem despesas com medicamentos, ferragens, cosméticos e acessórios (MAPA, 2016). Perante isso, as pesquisas com equídeos no Brasil, assim como nos demais países, seguem relacionadas às perspectivas da indústria, abrangendo a produção, manejo, melhoramento genético, reprodução, clínica e cirurgia (ALMEIDA; SILVA, 2010), possibilitando o crescimento de diferentes áreas. Dentre estas, um grande avanço no segmento biomédico, que abrange a biologia celular e a medicina regenerativa, estimulando o conhecimento sobre as células-tronco (VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002).

As células-tronco mesenquimais vêm sendo muito estudadas tanto visando melhoria na qualidade de vida do animal, quanto ao procurar possíveis

tratamentos para enfermidades de difícil ou nenhum tratamento. Por serem de fácil obtenção e manipulação *in vitro*, pouco imunogênicas, possuírem habilidade de integração ao tecido hospedeiro, entre outros critérios, as células mesenquimais são consideradas grandes candidatas para aplicação em terapia celular (PITTENGER et al, 1999). Na espécie equina, tem-se relatos do uso terapêutico das células tronco mesenquimais principalmente oriundas da medula óssea (GUEST; SMITH; ALLEN, 2008) e tecido adiposo, apesar de já ter sido evidenciado o isolamento das células originárias do sangue (KOERNER et al, 2006), geleia de Wharton (ROMANOV; SVINTSITSKAYA; SMIRNOV, 2003) e de outros tecidos placentários (VERFAILLIE, 2002).

Considerando a ausência de publicações relacionadas ao cultivo de células estromais em mini-horses, e por estes estarem ganhando notoriedade no meio equino, o presente trabalho visa à coleta, isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais de mini-horses, utilizando como fonte o tecido adiposo, para comparação de suas características *in vitro* e de seu transcriptoma com as células-tronco de equinos produzidas utilizando o mesmo protocolo.

1.1 Objetivo Geral

- Avaliar o isolamento de células-tronco mesenquimais, também chamadas de células estromais mesenquimais (MSCs), obtidas do tecido adiposo de mini-horses (*Equus Ferus caballus*), realizando a expansão *in vitro*, caracterização e diferenciação, bem como o transcriptoma.

1.2 Objetivo Específico

- Comparar o transcriptoma das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de cavalos (*Equus caballus*) e mini-horses (*Equus ferus caballus*).

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em seu conceito inicial, o presente trabalho surgiu como alternativa de potencializar a obtenção de CTMs no tratamento de enfermidades equinas, para isso viabilizando sua obtenção ao utilizar mini-horses como doadores de tecido adiposo, visto que os custos para obtenção e manutenção desses são inferiores quando comparados aos cavalos de porte regular.

Deste modo, inicialmente, esperávamos que as características gênicas expressas ao compararmos os animais fossem similares, considerando que o mini-horse é uma subespécie formada através de uma mutação de caráter recessivo no gene *Agreccan*.

Dados do presente estudo sugerem que apenas com exceção da angiogênese, as CTMs dos mini-horses apresentaram maiores expressões gênicas. Contudo, ainda há análises a serem realizadas como o perfil proteômico do meio condicionado produzido a partir das CTMs em cultivo, para potencializar o entendimento sobre as diferenças entre os animais estudados.