

Isolamento e Caracterização de Células-Tronco Mesenquimais de Músculo Cardíaco de Fetos de *Gallus gallus*

Pedro Henrique Mapelli¹, Raquel Calloni², Diego Bonatto³

1 Aluno de Iniciação Científica, Ciências Biológicas, UFRGS

2 PPGBCM, Centro de Biotecnologia, UFRGS

3 Centro de Biotecnologia, UFRGS



Introdução

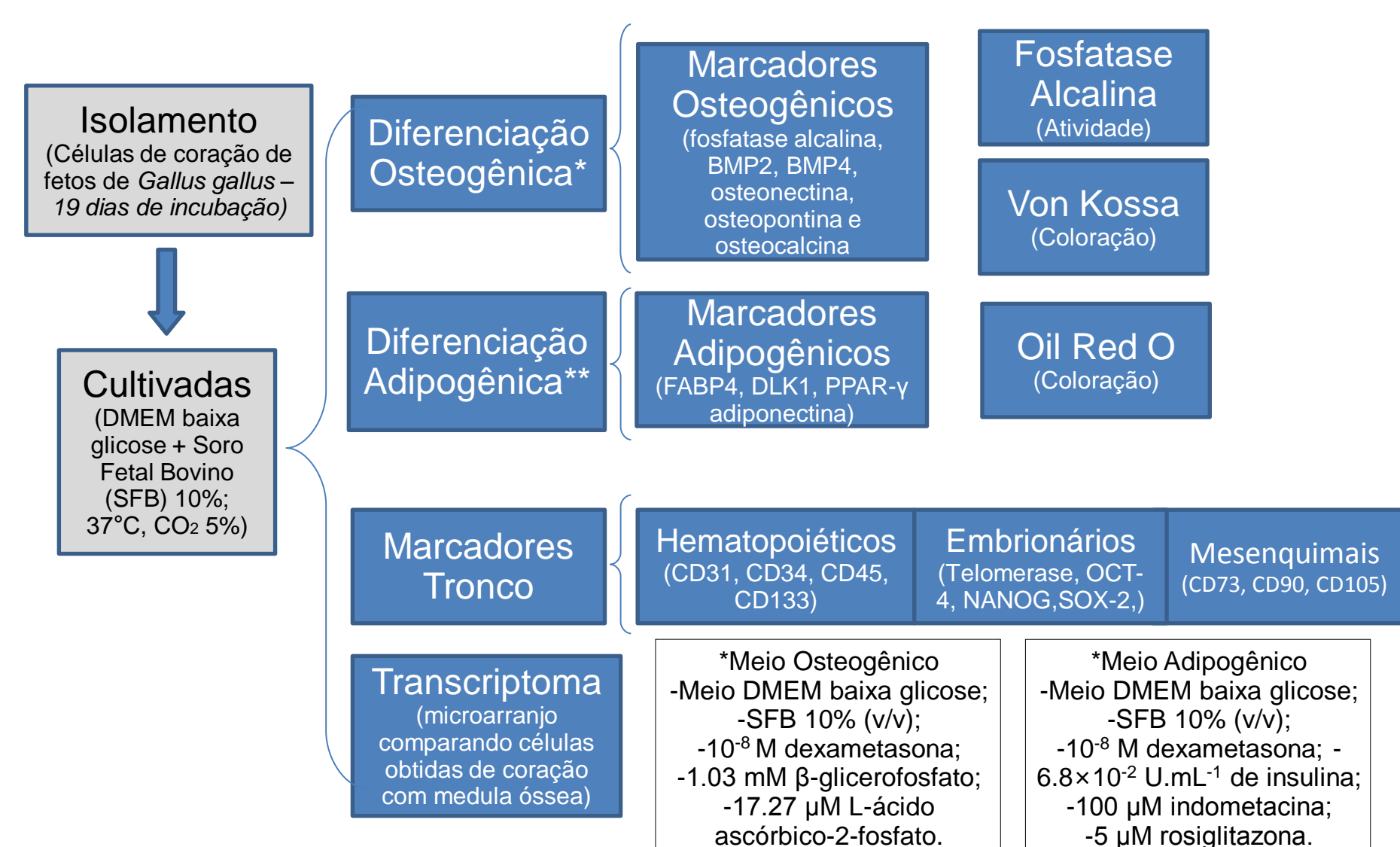
As células-tronco mesenquimais (CTMs) são caracterizadas pela capacidade de autorrenovarem-se e pelo potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. As CTMs estão presentes em diversos compartimentos anatômicos, tanto em fetos quanto em indivíduos adultos, tendo sido isoladas previamente de uma série de locais, como a medula óssea, o músculo esquelético e o músculo cardíaco.

Embora não sejam um modelo biológico amplamente usado na pesquisa com células-tronco, os fetos de *Gallus gallus* apresentam vantagens quando comparados a outros organismos modelo, tais como o seu baixo custo de manutenção, curto período de incubação dos ovos, fácil manuseio e baixa variabilidade genética.

Objetivo

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar as CTMs de músculo cardíaco de fetos de *G. gallus*.

Materiais e Métodos



Análise estatística: empregou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Isolamento e Expressão de Marcadores Tronco

As células apresentaram:

* Morfologia similar a fibroblastos;

* Aderência ao plástico.

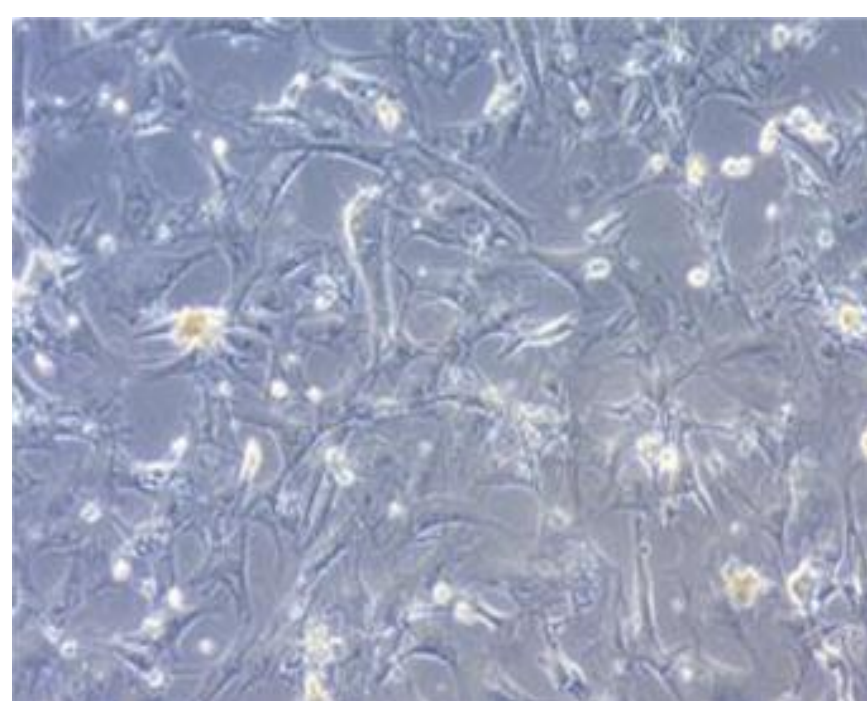


Fig. 1: Morfologia das células isoladas de músculo cardíaco de fetos de *Gallus gallus* com 19 dias de incubação. Aumento: 100x.

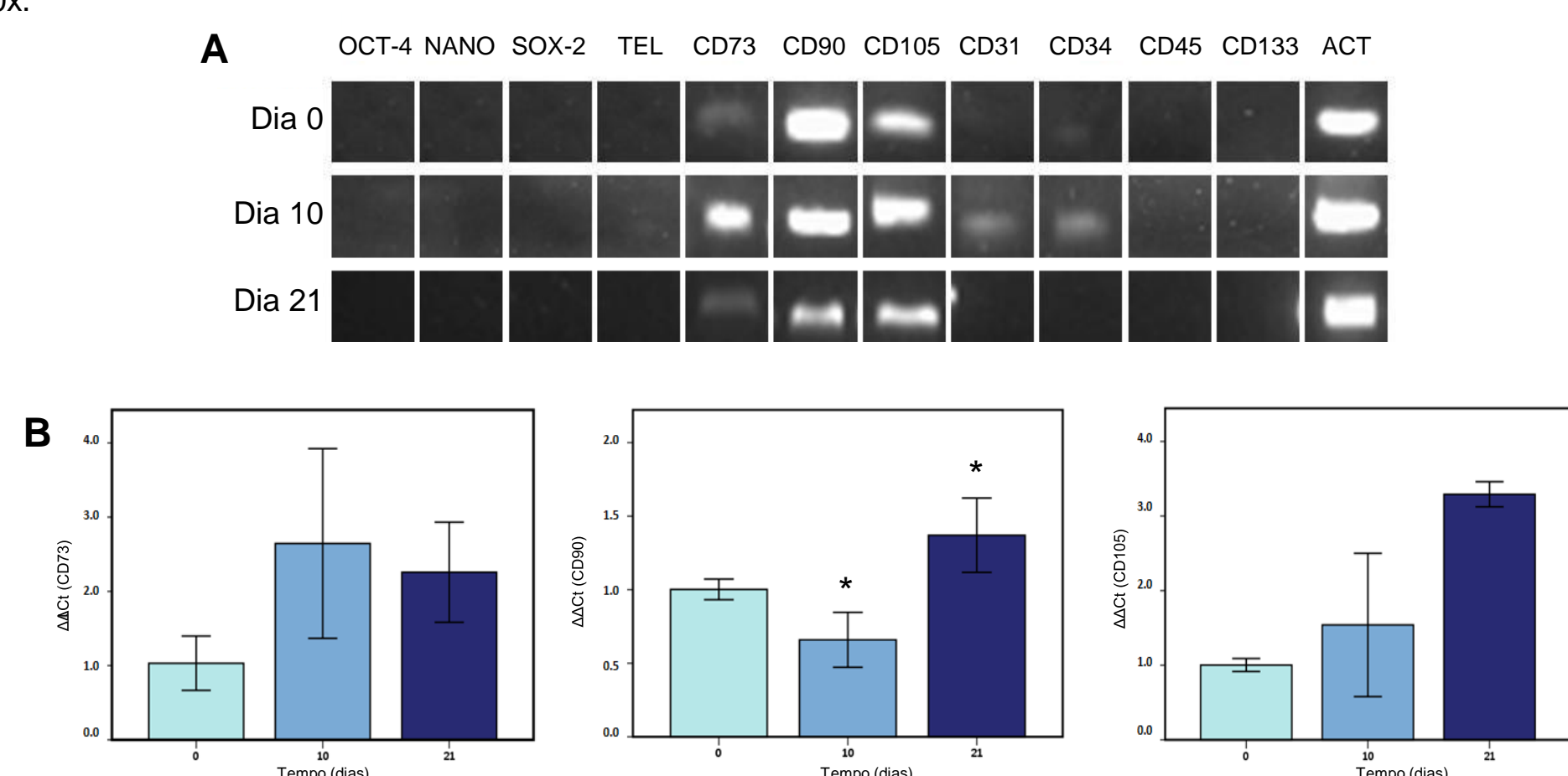


Fig. 2: Perfil de expressão de marcadores de estado tronco de células isoladas de músculo cardíaco de fetos de *Gallus gallus* durante a diferenciação osteogênica. (A) Expressão de marcadores tronco embrionários, mesenquimais e hematopoiéticos. Abreviações: NANOG (NANO); telomerase (TEL); β -actina (ACT). (B) Expressão relativa de marcadores tronco mesenquimais. Barras representam a média das replicatas técnicas. Barras de erro representam o erro padrão. O símbolo (*) representa níveis de expressão diferentes estatisticamente de acordo com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Ensaio de diferenciação

Não foi detectada diferenciação para adipócitos.

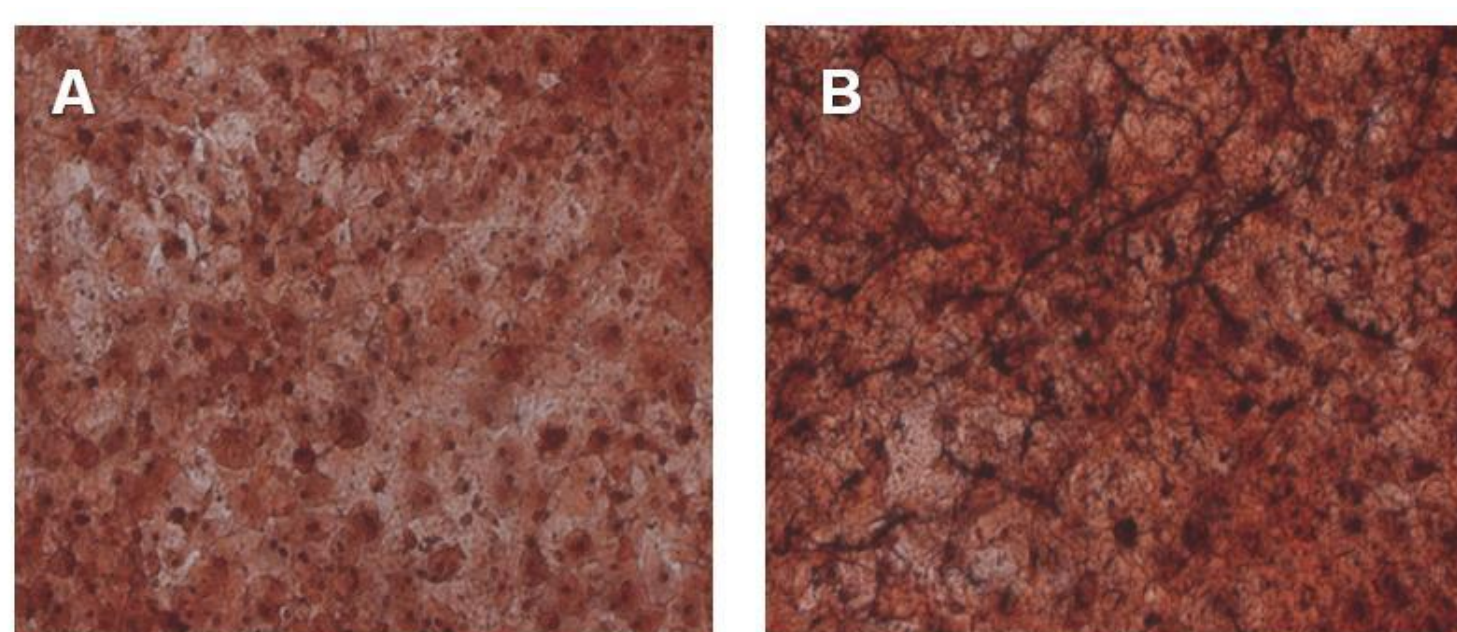


Fig. 3: Diferenciação osteogênica de células isoladas de músculo cardíaco de fetos de *Gallus gallus* com 18-19 ddi. (A) Controle e (B) células expostas ao meio de diferenciação osteogênica. Coloração von Kossa. Aumento de 100x.

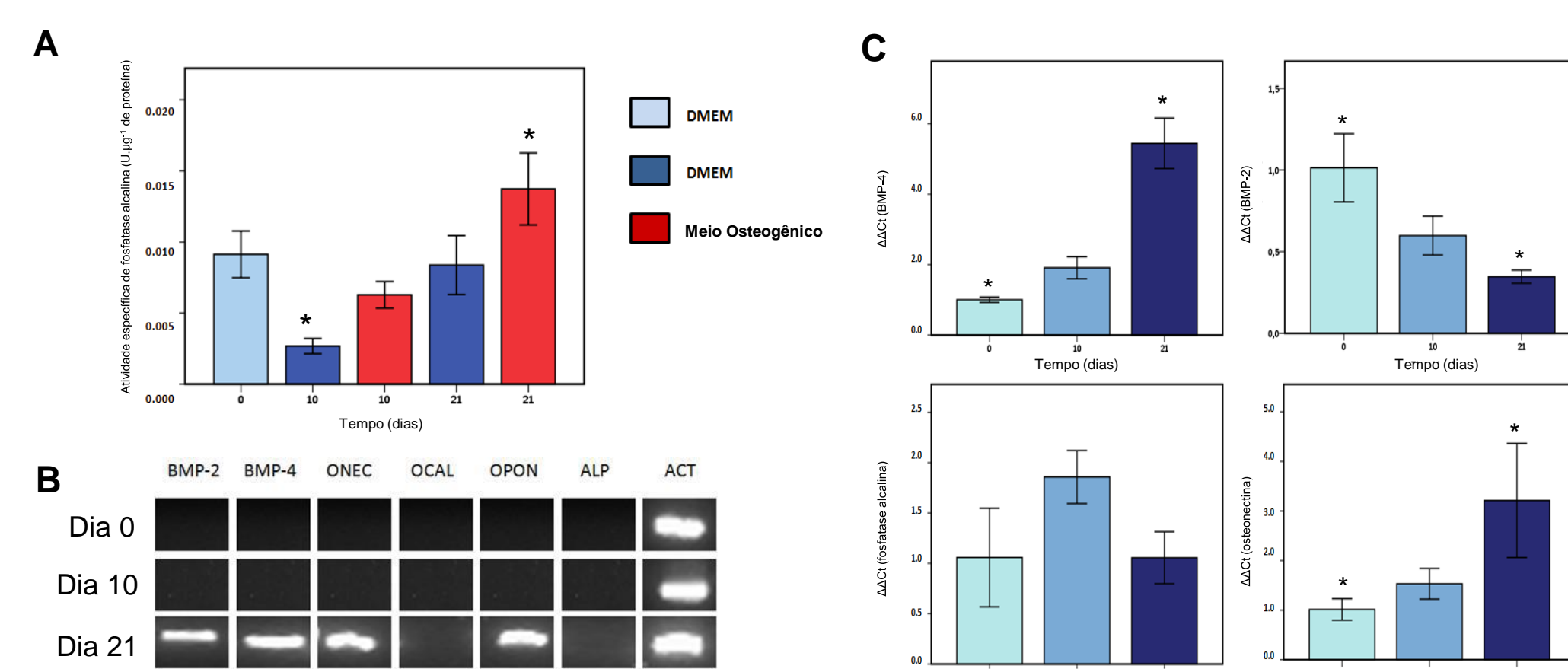


Fig. 4: Caracterização das células isoladas de músculo cardíaco de fetos de *Gallus gallus* induzidas a diferenciação osteogênica (A) Atividade específica de fosfatase alcalina. (B) Perfil de expressão de marcadores osteogênicos. Abreviações: *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2); *bone morphogenetic protein-4* (BMP-4); osteonectina (ONEC); osteocalcina (OCAL); osteopontina (OPON); fosfatase alcalina (ALP); β -actina (ACT). (C) Expressão relativa de marcadores osteogênicos por PCR em tempo real. Barras representam a média das replicatas técnicas. Barras de erro representam o erro padrão. O símbolo (*) representa níveis de expressão diferentes estatisticamente de acordo com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Análise de Transcriptoma

A análise de transcriptoma revelou que, quanto a sua função molecular e ao processo biológico no qual estão envolvidos, os genes superexpressos em células isoladas de coração estão relacionados à: morfogênese cardíaca (TBX20, GATA-4, GATA-6), processos de angiogênese (EDN1, TBX20, PRKCB1, GATA-4, GATA-6, AQP1, LAMA5), Diferenciação em músculo liso (EDN1, IGFBP5, GATA-4, GATA-6, EPAS1, FHL1) e coagulação sanguínea (EDN1, THBD, PLEK).

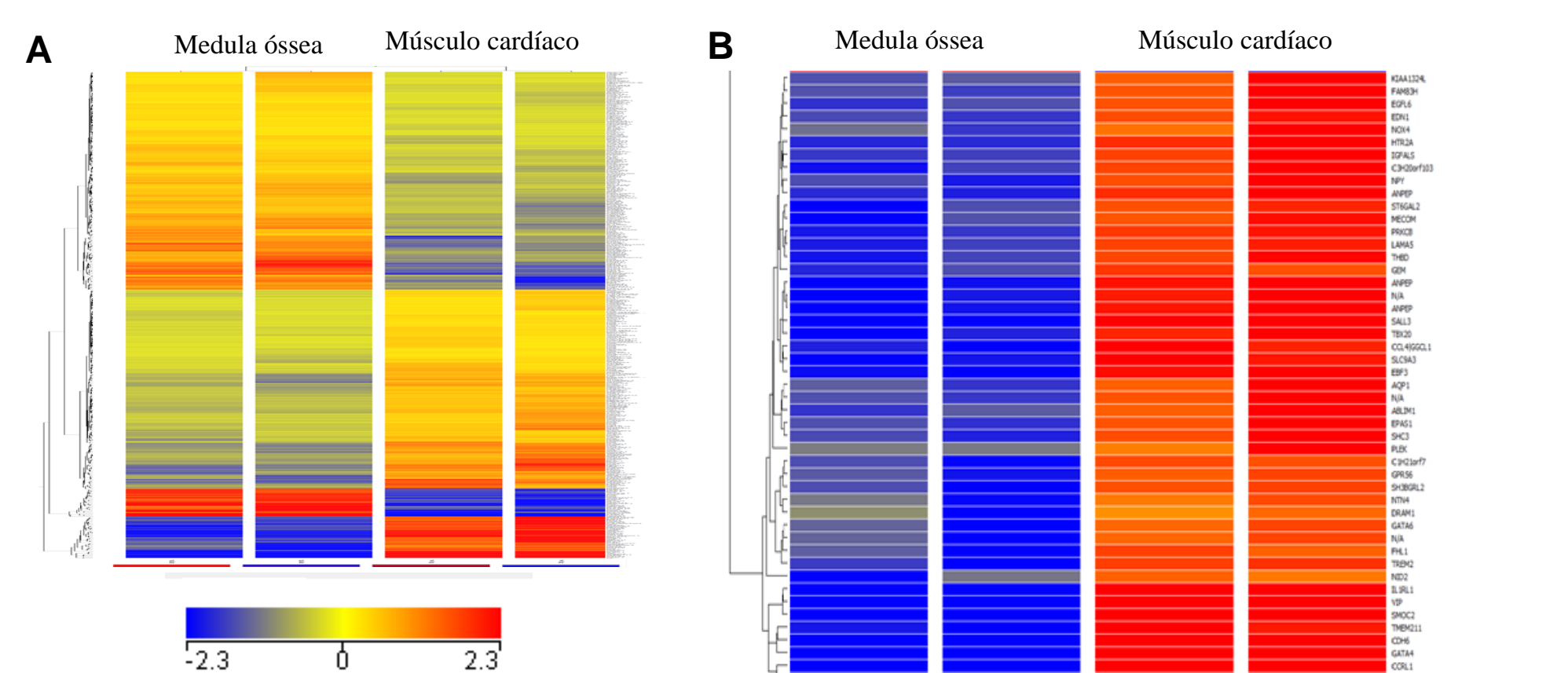


Fig. 5: Análise comparativa de transcriptoma de células isoladas de medula óssea e músculo cardíaco de fetos de *Gallus gallus* com 19 dias de incubação. (A) Heatmap do transcriptoma total das células analisadas. (B) Genes superexpressos em células isoladas de músculo cardíaco com relação à células isoladas de medula óssea.

Conclusão e Perspectivas

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que é possível isolar células do tecido cardíaco de fetos de *Gallus gallus*, as quais expressam marcadores de CTMs, diferenciam-se para osteoblastos, porém não para adipócitos. Estes resultados, somados à análise de transcriptoma, levam a hipótese de que as células isoladas do músculo cardíaco possam ser células derivadas do epicárdio (EPDCs). No entanto, uma caracterização mais detalhada é necessária para confirmar a identidade destas células.