

Isadora Bianchin¹, Guido Lenz²

1. Iniciação Científica, Biotecnologia Molecular, UFRGS; 2. Orientador, Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, UFRGS

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam potencial de diferenciação em células de origem mesenquimal, como osteócitos, adipócitos e condrócitos, havendo evidências da sua capacidade de diferenciação em células de outras origens embrionárias. Possuem ação parácrina – secreção de fatores que propiciam a regeneração do tecido lesado – e imunorreguladora, sendo então excelentes candidatas para estudos envolvendo terapia celular e regeneração de tecidos. No entanto, uma dificuldade dos estudos nessa área é a grande variação encontrada nos resultados, sobretudo devido às diferenças nos protocolos de cultivo das CTM.

A criação de linhagens celulares imortalizadas surge como alternativa para aumentar a concordância das pesquisas na área. A imortalização capacita a proliferação de células em cultura por períodos prolongados e indefinidos, por meio do aumento da expressão da subunidade catalítica da telomerase (hTERT), enzima responsável pela manutenção da integridade cromossômica.

OBJETIVO

Criar linhagens celulares imortalizadas a partir de CTM isoladas de medula óssea, rim e pulmão de camundongos C57bl/6 utilizando vetor retroviral contendo o gene da hTERT e o gene de resistência à neomicina (NEO).

MATERIAIS E MÉTODOS

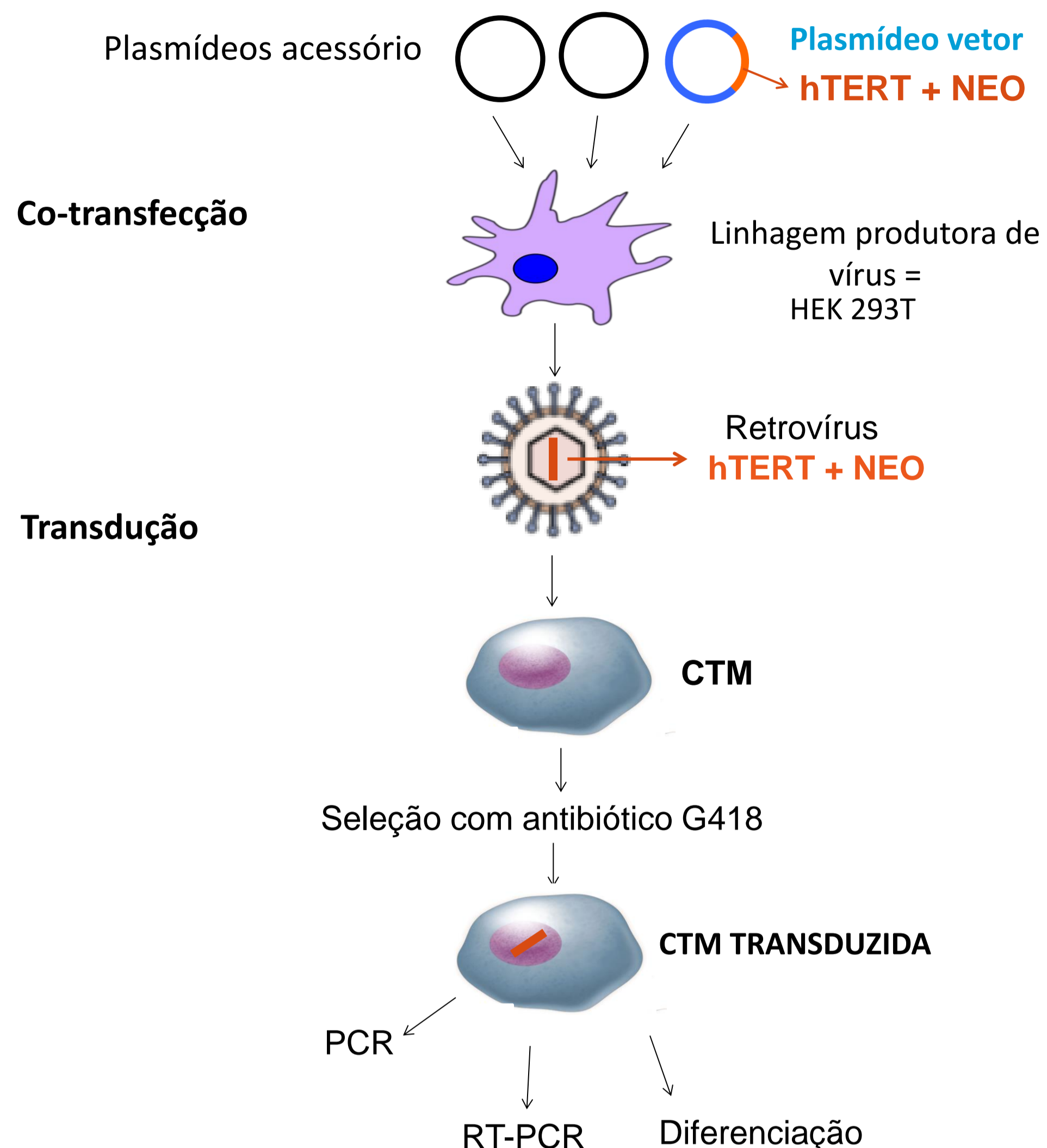


Figura 1. Imortalização de CTM: Co-transfecção de vetor plasmidial portador do gene hTERT e plasmídeos acessório em células HEK293T para produção de vetor retroviral com gene hTERT. Transdução das CTM com o vetor obtido. Seleção das células transduzidas e testes para validação da imortalização e capacidade de diferenciação.

RESULTADOS

O plasmídeo vetor pBABE-neo-hTERT foi produzido em bactérias da linhagem XL1-blue e, posteriormente, transfectado em células da linhagem HEK293T juntamente com os plasmídeos acessórios (codificadores do envelope, capsídeo e enzimas) necessários para a produção de vetor retroviral. Em seguida o vetor foi usado para transduzir CTM isoladas a partir de pulmão (CTMP). As células foram incubadas com o vetor por 16h utilizando 8 µg/mL de polibreno.

A eficácia da transdução foi comprovada pela seleção das células com antibiótico G418, em concentração pré-estabelecida de 1mg/mL, durante duas semanas. (Fig. 2)

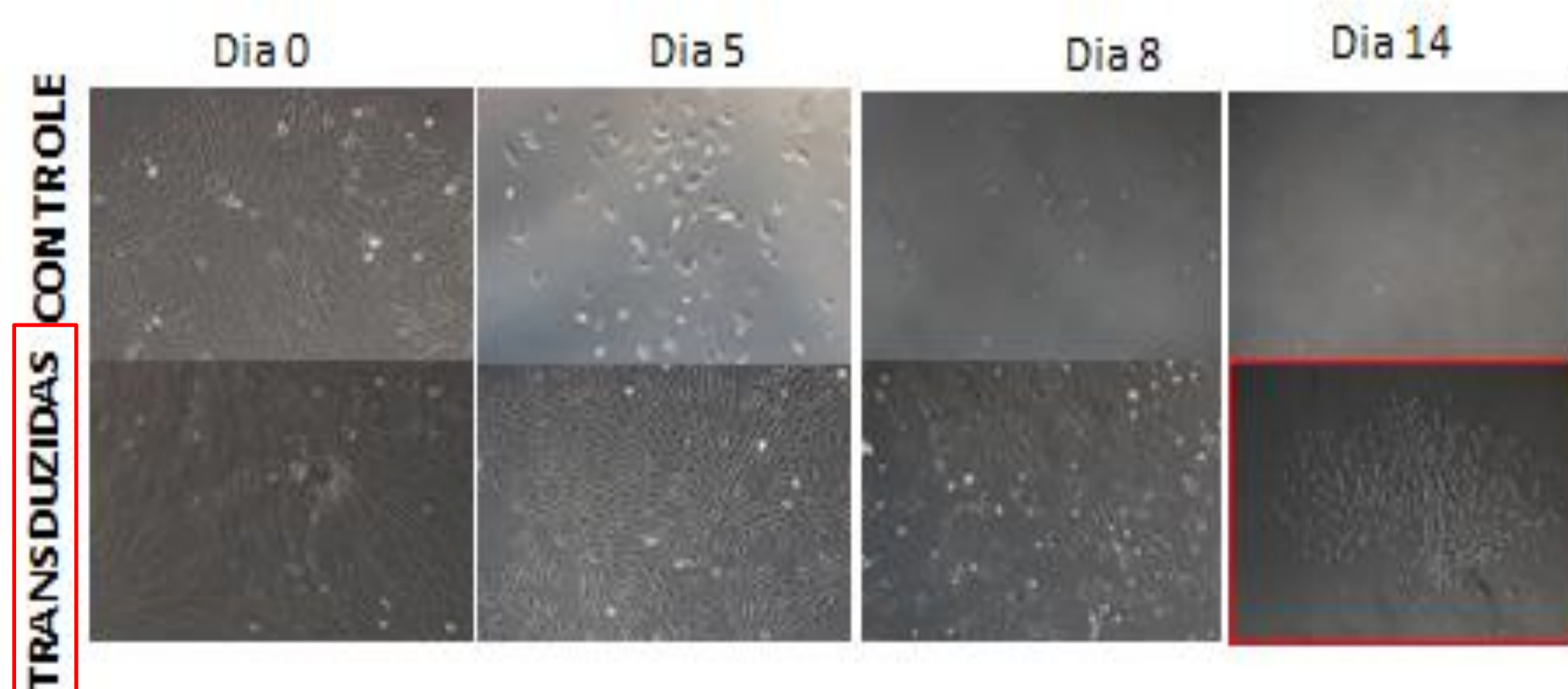


Figura 2. Seleção das CTMPs transduzidas utilizando 1mg/mL de G418

O sucesso da imortalização foi validado por meio de PCR e RT-PCR para o gene da hTERT, demonstrando, respectivamente, a inserção do gene hTERT no genoma das CTMPs e sua expressão. (Fig.3)

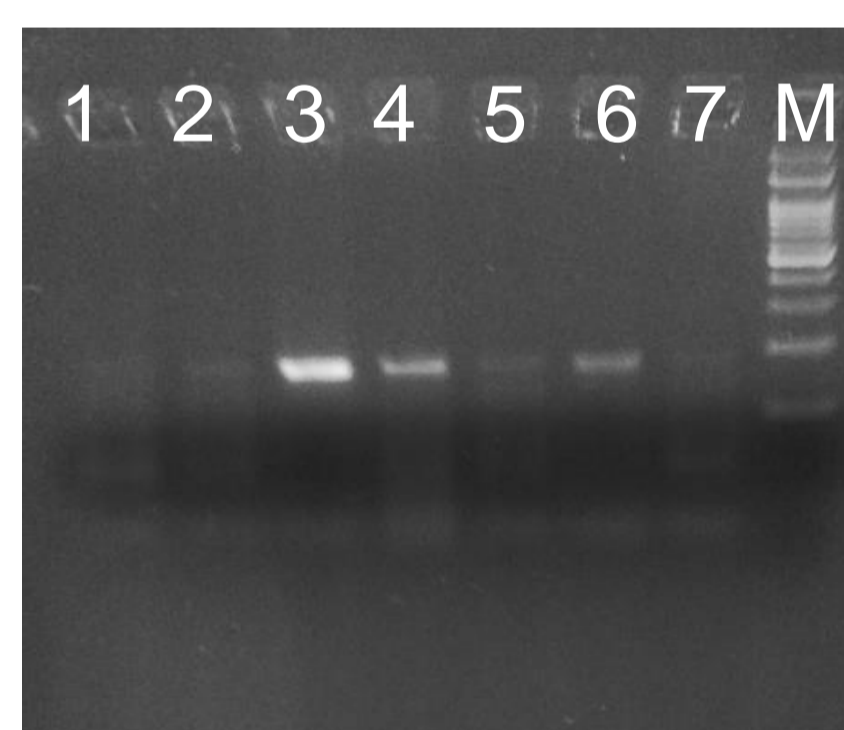


Figura 3. RT-PCR (poços 1 a 5) e PCR (poços 6 e 7) para gene hTERT: poços 1 e 2, amostras de CTMP não transduzidas. 3, plasmídeo vetor pBABE-neo-hTERT (controle positivo). 4, cDNA de CTMP transduzidas. 5, controle negativo. 6, DNA de CTMP transduzida. 7, controle negativo. M, marcador de peso molecular.

Experimentos iniciais de diferenciação em adipócitos foram conduzidos nas CTMP imortalizadas. Após duas semanas em meio indutor da diferenciação, as células apresentaram morfologia característica de células adipogênicas, como acúmulos de vesículas. (Fig.4)

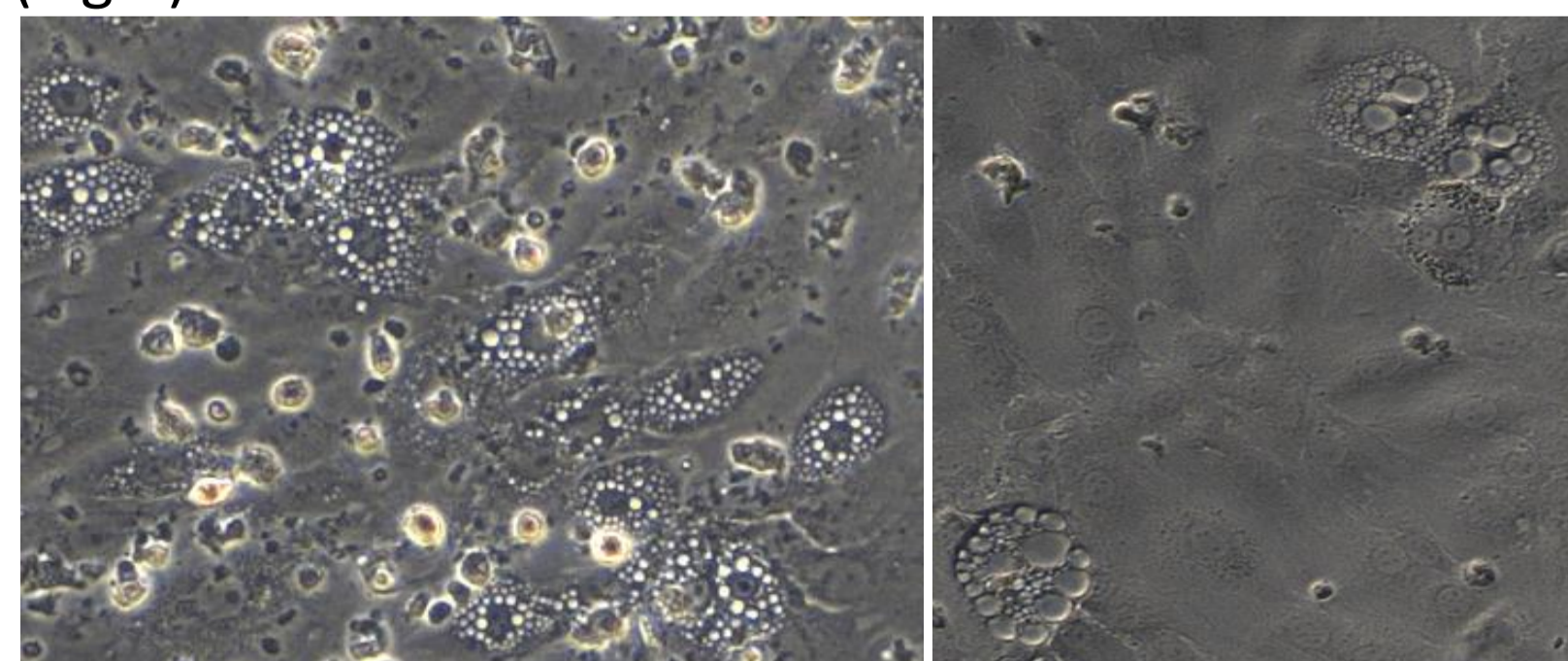


Figura 4. Diferenciação adipogênica das CTMP imortalizadas.

CONCLUSÃO

As CTMPs foram eficientemente transduzidas com o vetor contendo o gene hTERT e selecionadas. Os ensaios de PCR e RT-PCR confirmaram a integração do vetor ao genoma das CTMPs e a sua expressão, respectivamente. Estas células foram expostas a meio indutor adipogênico e, após duas semanas, apresentaram variação morfológica compatível com adipócitos.

Os resultados preliminares apresentados mostram que já está estabelecida uma plataforma de imortalização celular em nosso laboratório.

PERSPECTIVAS

Aprimorar a validação de diferenciação adipogênica por meio de testes de coloração específica e verificar a capacidade de diferenciação das CTM imortalizadas em osteócitos.

Comparar a cinética de cultivo de CTM imortalizadas e não- imortalizadas por meio de population doubling.

Avaliar taxa de senescência em CTM imortalizadas e comparar com as de células não-imortalizadas.

Imortalizar CTMs isoladas de diferentes órgãos.