

Análise dos Meios de Cultura de Células Tronco Adiposo Derivadas Humanas Indiferenciadas e Diferenciadas em Pré-adipócitos e

Osteoblastos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Ana Carolina M. Milanezi¹, Sílvia Resende Terra¹, Vanessa Schein¹, Letícia Pettenuzzo¹, Bárbara Paranhos Coelho¹, Ana Carolina de Mattos Zerie²

Orientadora: Fátima C. R. Guma¹

¹ Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas, SP.



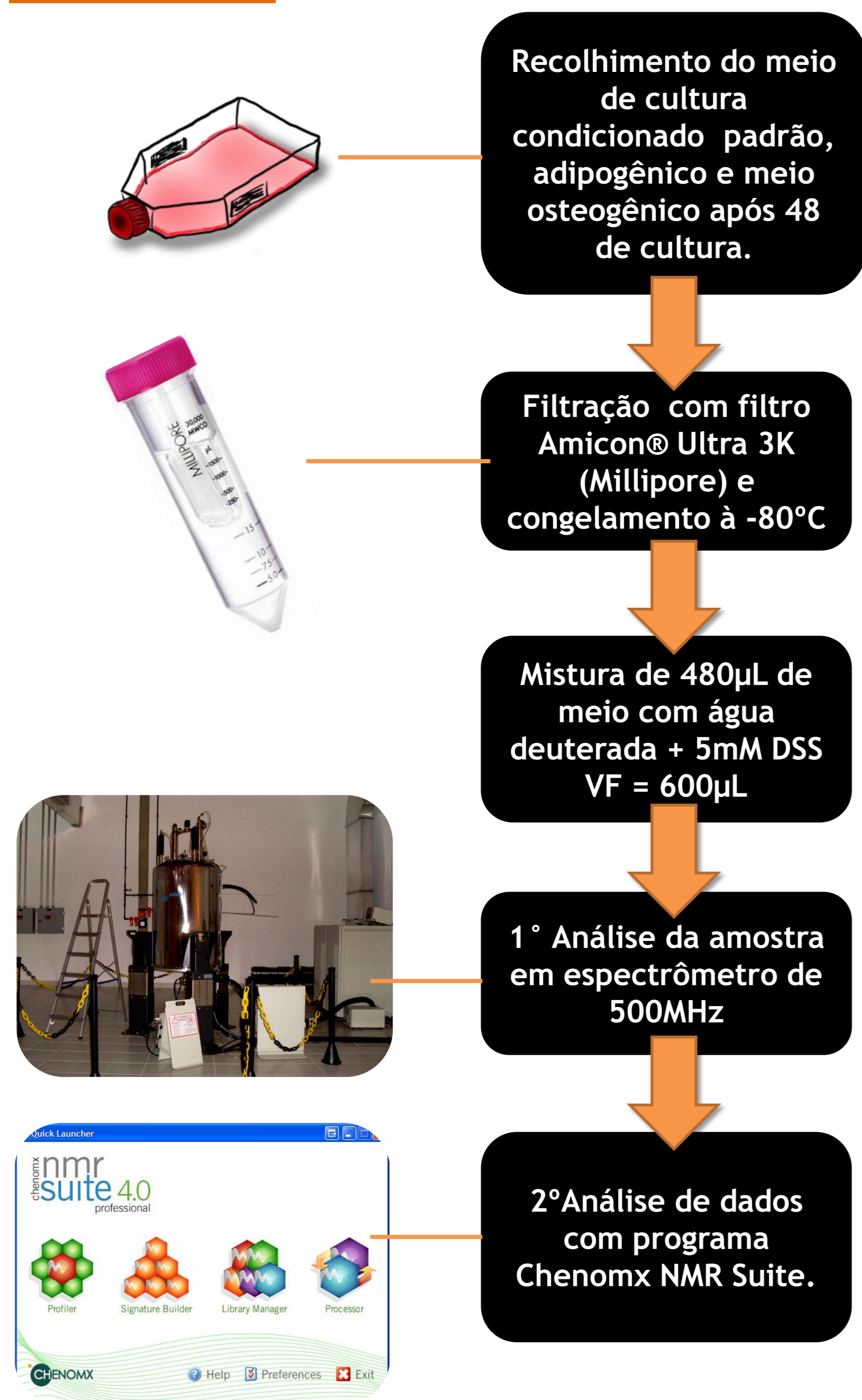
INTRODUÇÃO

O metaboloma realizado por ressonância magnética nuclear (RMN) busca uma descrição analítica de amostras biológicas complexas com o objetivo de caracterizar e quantificar pequenas moléculas (<3000 Da) através de comparação com compostos de referência. Metabólitos são o resultado final de todo o complexo regulatório de um organismo ou célula, incluindo a regulação transcricional, regulação translacional e modificação pós-traducional. Alterações metabólicas são, portanto, os repórteres mais próximos de alterações de vias bioquímicas como glicólise, ciclo de Krebs, síntese de uréia e transaminação. Assim, o objetivo deste estudo é identificar o perfil metabólico de células tronco adiposo derivadas (ADSC) indiferenciadas ou diferenciadas em adipócito e osteoblasto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de células: O tecido adiposo humano foi obtido de lipoaspirados eletivos seguindo as normas institucionais da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O lipoaspirado foi lavado com PBS e tratado com 0,075% de colagenase tipo I em PBS por 30 minutos a 37°. A colagenase foi inativada com igual volume de DMEM/10% SFB e a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. A fração estromal foi ressuspensa em DMEM/10% SFB e a cultura realizada em garrafas 75 cm². Entre a 3^a e a 8^a passagem as células foram induzidas para diferenciação adipogênica com 1 µM de dexametasona, 10 µM de insulina, 200 µM de indometacina, e IBMX 0,5 mM; e osteogênica com 50µM de ácido ascórbico, 0,01M de β-glicerofosfato e 0,1µM de dexametasona, respectivamente.

Análise por RMN:



RESULTADOS

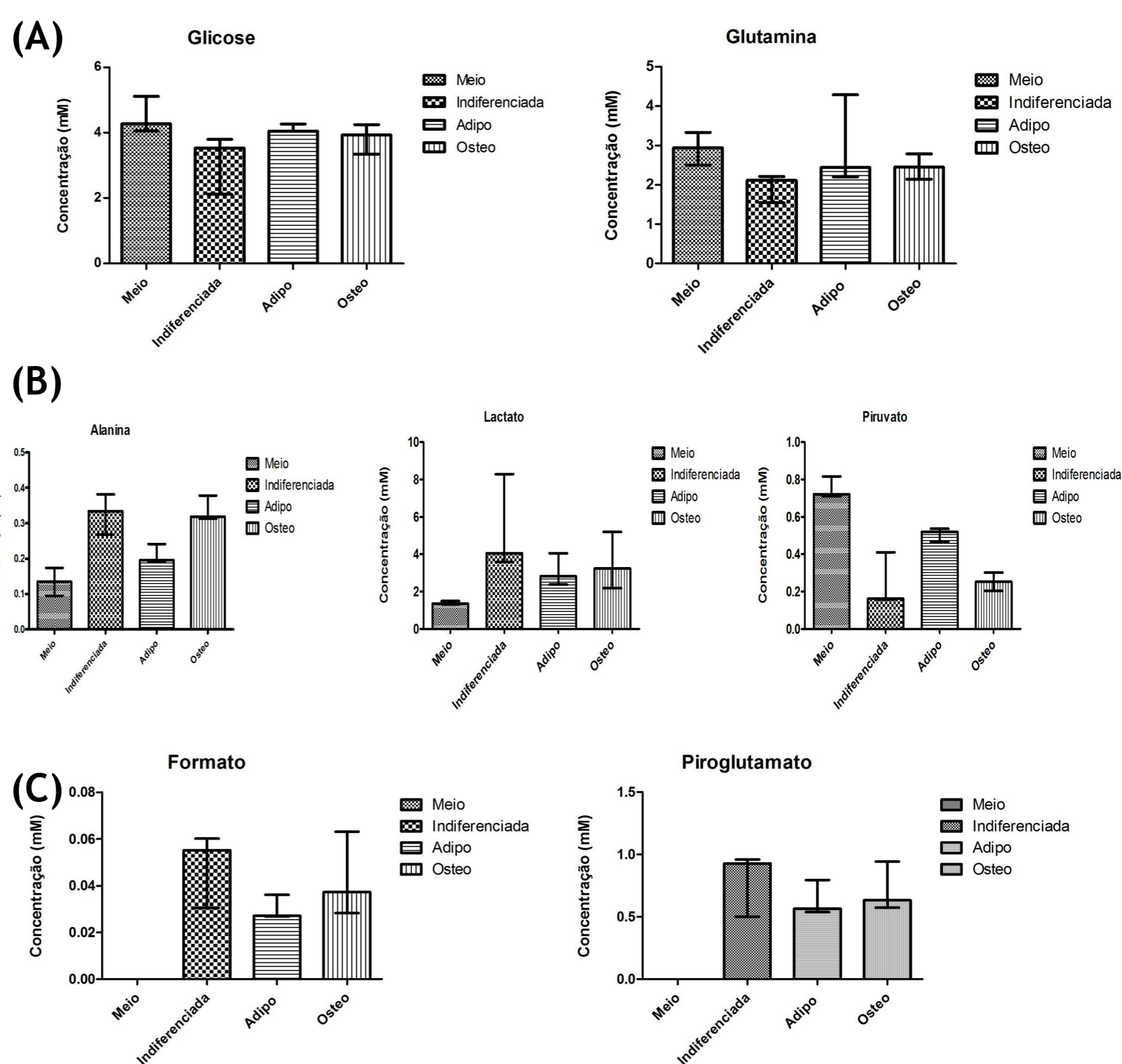


Figura 1: Análise por RMN dos meios condicionados por ADSCs humanas: (A) Glicose e Glutamina, (B) Alanina, lactato e piruvato e (C) formiato e piroglutamato. Meio = análise dos componentes do meio de cultura, Indiferenciada, Adipo e Osteo= análises dos meios condicionados por ADSCs indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos ou osteoblastos. Os resultados representam a mediana ± intervalo entre quartis dos resultados obtidos na análise das ADSC de 3 pacientes.

CONCLUSÃO

A análise do metaboloma feita através da comparação com os componentes do meio utilizado para a cultura das células, mostrou que o consumo de **glicose e glutamina**, principais combustíveis para células em cultura, foi semelhante entre as células indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos (Figura 1-A). A figura 1-B mostra que tanto ADSCs quanto células submetidas a diferenciação consomem **piruvato** e produzem de **alanina e lactato**.

Um dado interessante foi a produção e liberação para o meio de cultura de formiato e piroglutamato, dois compostos que não são encontrados no meio de cultura (Figura 1-C). As células indiferenciadas parecem secretar maior quantidade que os adipócitos e osteoblastos.

Populações específicas de células, especialmente, células troncos, são aptas a sobreviver em condições de hipóxia com desvio para respiração anaeróbica. Nessas condições essas células respondem com o aumento da produção de lactato e alanina. As mudanças observadas no perfil metabólico das ADSCs estão relacionadas a diferentes rotas metabólicas utilizadas pelas células no estado indiferenciado ou durante a diferenciação adipogênica e osteogênica; a Figura 1-B mostra, por exemplo, que os pré-adipócitos consomem menos piruvato e produzem menos alanina. Sendo assim a análise por ressonância magnética nuclear (RMN) dos metabólitos dos meios de cultura de células tronco adiposo derivadas (ADSC) indiferenciadas ou diferenciadas em adipócito e osteoblastos demonstrou ser uma ferramenta útil para o entendimento do metabolismo durante o processo de diferenciação.

APOIO: CAPES, CNPq, FAPERGS, INCT-EN.

REFERÊNCIAS

- Nicholson JK, Lindon JC. *Systems biology: Metabonomics*. Nature v. 455, p.1054-1056, 2008.
- Turner WS. et al. *Nuclear magnetic resonance metabolomic fingerprinting of human hepatic stem cells and hepatoblasts cultured in hyaluronan-matrix hydrogels*. Stem Cells v. 26, n° 6, p.1547-1555, 2008
- Bobis, S. et al. *Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications*. Folia Histochemica et Cytobiologica, v. 44, n° 4, p 215-230, 2006.
- César N, Jerome R, Leslie ES. *The elusive nature and function of mesenchymal stem cells*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 12, p. 126-131, 2011
- Zuk PA et al. *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Molecular biology of the cell v. 13, p. 4279-4295, 2002