

**UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI**  
**Departamentul de Biochimie și Biologie Moleculară**

**Proiect PCCE – Cod CNCSIS 248**

Site <http://pcce248.weebly.com/>

**NOI CONCEPTE SI STRATEGII PENTRU DEZVOLTAREA CUNOASTERII UNOR  
NOI STRUCTURI BIOCOMPATIBILE IN BIOINGINERIE**

**Raport anual de activitate**

Partenerul P1 și coordonatorul echipei de cercetare a fost implicat în perioada 01.06.2010 – 10.12.2010 în realizarea următoarelor activități științifice la de **Obiectivul 2** intitulat: «**Dezvoltarea unor strategii de regenerare a țesutului adipos prin implantarea celulelor stem adulte derivate din țesut adipos uman (ADAS) în structuri scaffold 3-D, ce mimează matricea extracelulară (ECM), destinate reconstrucției unor defecte ale țesuturilor moi (traume severe, arsuri profunde sau rezecții de tumori)**»:

2.3. Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a suporturilor 3-D selectate – al doilea nivel de selecție;

2.4. Stabilirea numărului de hidrogeluri și a formei lor de prezentare, în vederea parcurgerii complete în condiții optime a întregului set de teste pentru biocompatibilitate și diferențiere;

2.6. Optimizarea metodelor de izolare a celulelor ADAS și de cultivare a lor în sisteme 2-D;

2.7. Inducția diferențierii adipogenice în sistem 2-D în prezența unor factori adipogenici, monitorizarea procesului și identificarea markerilor specifici adipocitelor.

**Deoarece activitățile 2.3 – 2.6 vor continua și în anul 2011, în acest an vom raporta doar date parțiale.**

**Evaluarea biocompatibilității in vitro a suporturilor 3-D selectate; Stabilirea numărului de hidrogeluri și a formei lor de prezentare (activitățile 2.3 și 2.4)**

Pentru a produce un substituent tisular reprezentativ pentru țesutul existent *in vivo*, trebuie realizată cu cultură celulară 3-D care să mimeze atât structura cât și organizarea spațială a matricei extracelulare (ECM). În consecință, există un interes deosebit pentru dezvoltarea unor structuri scaffold 3D, în cadrul cărora hidrogelurile dețin un loc important [1]. Aceste suporturi trebuie să fie biodegradabile, permițând înlocuirea lor cu o ECM sintetizată *de novo* de celulele înglobate în vederea restabilirii proprietăților structurale și funcționale ale țesutului supus ingineriei tisulare [2]. Hidrogelurile trebuie să aibă o structură stabilă și puternic hidratată [3] pentru a permite difuzia substanțelor nutritive și moleculelor de semnalizare la celule, menținând astfel viabilitatea celulară și facilitând interacțiile paracrine. Porozitatea hidrogelurilor trebuie să permită popularea lor de către celule cu menținerea fenotipului celular dorit. În plus, structurile 3D nu trebuie să genereze un răspuns imun, să nu existe pericolul rejecției imunologice.

Partenerul P1 a primit **trei tipuri de hidrogeluri: A** (de la partenerul P7), **B și C** (de la partenerul P3). Hidrogelul tip A are o matrice pe bază de alginat, hidrogelul tip B a fost preparat din fibroină (RSF) și poliacrilamidă (PAA) în trei variante experimentale RSF/PAA 50/50; 20/80 și 10/90, iar hidrogelul tip C conține colagen (COL) și acid hialuronic (HA) în trei variante experimentale COL/HA 1/2; 2/2 și 2/1, în condițiile utilizării unei soluții de colagen 1,2 % și a reticulării cu glutaraldehidă 0,25 %.

Pe geluri s-au însămânțat fibroblaste dermice umane linia CCD-1070 SK (ATCC) și cultura a fost realizată în mediu MEM (Sigma-Aldrich Co.) suplimentat cu 1% amestec antibiotic/antimicotic ABAM (Sigma-Aldrich Co.) și 10% ser fetal bovin FBS (Gibco). Celulele au fost incubate la 37°C într-o atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub> și 95% O<sub>2</sub>. Biocompatibilitatea a fost apreciată prin inspectarea evoluției culturii în timp la un microscop în contrast de fază, realizarea testului MTT și evaluarea eliberării lactat dehidrogenazei (LDH) din citosol (kitul TOX-7, Sigma-Aldrich Co.) – care permit aprecierea viabilității/proliferării celulare și a citotoxicității hidrogelului.

**Hidrogelul A** prezintă structura unui strat cu grosimea de 2mm în care celulele au fost încapsulate la o densitate celulară de  $4 \times 10^5$  celule/ml. După polimerizarea sa în plăci Petri de 8cm<sup>2</sup>, matricea de alginat a fost acoperită cu 2 ml mediu suplimentat cu 10% SFB. Inspectarea culturii la microscop a demonstrat că pe parcursul perioadei de cultivare de 6 zile, celulele au rămas ca formațiuni rotunde dispersate, o caracteristică a celulelor incluse în microsferă de alginat. În urma tratamentului cu soluția de MTT, celulele viabile active metabolic au înglobat intracelular cristale de formazan. Pentru a avea o imagine mai completă a biocompatibilității hidrogelului A, acesta a fost solubilizat într-o soluție 0,15 mM NaCl ce conține 55 mM citrat de sodiu și 5 mM EDTA, ce permite recuperarea celulelor. Viabilitatea celulară, evaluată prin metoda excluderii colorantului Albastru Tripan, a scăzut la 76% după 3 zile și la 40% după 6 zile de la însămânțare. Aceste rezultate confirmă datele obținute prin testele MTT și LDH care au demonstrat scăderea numărului de celule active metabolic și pierderea treptată a integrității membranare pe parcursul perioadei de cultură. De asemenea, rezultatele indică faptul că difuzia substanțelor nutritive din mediul de cultură prin matricea de alginat este insuficientă pentru a susține viabilitatea celulară pe parcursul perioadei de cultură. Mai mult chiar, gradul de înrețelare mare al acestui hidrogel, reflectat prin analiza SEM, (Raport P3) poate determina un stres mecanic asupra celulelor conducând în final la moartea lor [4]. Prin urmare, studiile viitoare vor avea drept scop obținerea unor hidrogeluri cu o structură mai relaxată dar stabile.

În cazul **hidrogelurilor tip B**, sterilizate prin expunere în UV, celulele au fost însămânțate pe suprafața matricei la o densitate de  $1,2 \times 10^4$  celule/cm<sup>2</sup>. Inspectarea culturilor timp de 72 ore la microscopul cu inversie, precum și testele MTT și LDH arată că hidrogelul dezvoltă slabe efecte citotoxice care cresc direct proporțional cu concentrația acrilamidei în probe.

**Hidrogelurile tip C** nu au fost stabile în condiții standard de cultivare (atmosfera umedă de 37°C, 95% aer și 5% CO<sub>2</sub>).

### **Optimizarea metodelor de izolare a celulelor ADAS și de cultivare a lor în sisteme 2-D (activitatea 2.6)**

Celulele stem derivate din țesutul adipos ADAS reprezintă o populație de celule multipotente care aderă la suprafețe din plastic și au caracteristici similare cu celulele stem mesenchimale izolate din măduva osoasă (MSC). Studiile asupra celulelor ADAS prezintă un avantaj important – accesibilitatea sursei de izolare. Țesutul adipos este ușor de izolat, în cantități mari, permițând izolarea unui număr adecvat de celule pentru posibile terapii umane. Tentativele clinice de utilizare a celulelor ADAS nu au fost urmate de efecte adverse.

În experimentele noastre am izolat celulele ADAS din lipoaspirate obținute după protocolul și cu personalul medical al Spitalului Clinic de Urgență, Chirurgie Plastică,

Reparatorie și Arsuri, Grivița, București, după obținerea consimțământului pacienților. Din studiu au fost excluși pacienți afectați de cancer, infecții, inflamații cronice sau acute și boli autoimune. Pacienții nu au luat anterior steroizi sau tiazolidinedione.

Tehnica de procesare a lipoaspiratului (LA) și de izolare a celulelor ADAS a fost optimizată urmărind în principial protocolul descris de **Gimble și colab.** [5]. De asemenea a fost utilizată și fracția sangvină a LA, care în mod obișnuit este aruncată.

#### Procesarea lipoaspiratului

Dupa prelevare/transport, LA a fost lăsat în repaus 10 minute la temperatura camerei pentru decantare. Se separă trei fracții, dintre care două: fracția de țesut adipos și fracția sangvină, au fost utilizate pentru izolarea celulelor ADAS.

#### Separarea celulelor ADAS din fracția de țesut adipos

Această fracție conține fragmente tisulare fin mărunțite contaminate cu diferite tipuri celulare. Procedul constă în 1) spălarea fracției pentru a îndepărta majoritatea eritrocitelor și leucocitelor; 2) dispersia țesutului adipos prin digestia cu collagenază, 3) centrifugarea digestului când se separă populația adipocitelor mature care plutesc în mediu și fracția vascular stromală (SVF) ce sedimentează și 4) izolarea celulelor ADAS din fracția SVF prin îndepărtarea eritrocitelor și resturilor celulare și tisulare.

Procedul durează 5 – 6 ore; din 1.000 ml LA se obțin aproximativ  $10^7$  celule ADAS.

#### Cultivarea celulelor ADAS

După ultima etapă de centrifugare, sedimentul SVF a fost resuspendat în mediu DMEM/F12 suplimentat cu SFB și însămânțat în plăci de cultură de 100 mm la o densitate de  $1 \times 10^6$  celule/placă. Suspensia celulară a fost incubată la 37°C, 95%RH și 5% CO<sub>2</sub> mai mult de 24 ore. Mediul de cultură a fost schimbat a doua zi cu DMEM/F12 suplimentat cu 10% SFB. Când celulele ajung la 80 % confluență se realizează un pasaj la raportul 1:3 cu tripsină/EDTA. Pe măsura pasajelor cultura de celule este îmbogățită în celule ADAS.

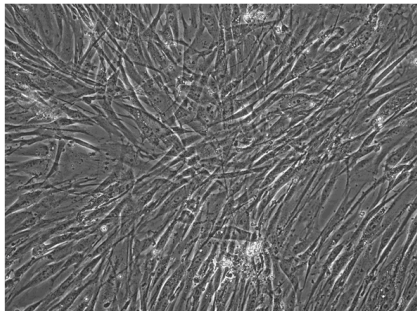


Fig.1. Cultura primară de celule ADAS la 10 zile după însămânțare, imagine de microscopie în contrast de faza, obiectiv 10x.

Cultura a fost monitorizată din punct de vedere morfologic prin microscopie în contrast de faza până la pasajul III inclusiv. Celulele obținute sunt aderente și prezintă un fenotip fibroblastic, așa cum reiese din **Fig.1**. Începând cu pasajul IV, celulele ADAS au fost utilizate pentru studiile de validare a culturii și de diferențiere adipogenică prezentate în acest raport.

### **Validarea culturii de celule ADAS**

Deoarece această etapă este fundamentală pentru îndeplinirea Obiectivului 2, validarea culturii de celule ADAS s-a realizat prin RT-PCR, western blot și microscopie de fluorescență.

Într-o primă etapă s-a demonstrat expresia unor antigene specifice celulelor stem: CD44, CD71; CD73 și CD90, prin studii RT-PCR parcurgând următoarele etape de analiză:

**i) extracția ARN** – cu kitul Sigma *Tri-Reagent* dintr-o cultură de celule ADAS ( $1-3 \times 10^6$  celule), în urmă căreia sedimentul uscat de ARN a fost solubilizat cu 10-40  $\mu$ l apă filtrată "RNA-se free";

ii) **evaluarea spectrofotometrică a purității preparatului de ARN** pe baza raportului  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$ ; o valoare 1,9-2,1 indică o puritate corespunzătoare;

iii) **obținerea ADN complementar (ADNc) prin revers transcripție** utilizând kitul Bio-Rad *iScript cDNA Synthesis* și un termociclu Bio-Rad;

iv) **amplificarea genică pentru fiecare țintă (CD44, CD71, CD73, CD90)** și optimizarea temperaturii de anelare specifică perechilor de primeri desemnați.

#### Primerii de amplificare utilizați:

Secvența țintă	secvența Primer
• CD 44 sens	CATTCAAATCCGGAAGTGCT
• CD 44 antisens	GTTGCCAAACCACTGTTCT
• CD 71 sens	TGCTGTGATCGTCTTTTCTTGA
• CD 71 antisens	TCATCCCAATATAAGCGACGTG
• CD 73 sens	CGCAACAATGGCACAATTAC
• CD 73 antisens	CTCGACACTTGGTGCAAGA
• CD 90 sens	TGAAGGTCCTCTACTTATCCGC
• CD 90 antisens	GCACTGTGACGTTCTGGGA

v) **analiza produșilor PCR prin electroforeză** în gel de agaroză 2 % în prezența markerilor de masă moleculară 100 pbz (Promega), bromură de etidiu (Roth), vizualizare la un transiluminator UV și apoi cuantificarea benzilor cu programul BioGene. Apariția unei singure benzi (un singur produs PCR) la greutatea moleculară așteptată indică faptul că reacția de amplificare s-a produs (antigenul de suprafață s-a exprimat) iar primerii s-au legat la acea temperatură.

În urma acestor studii s-a pus în evidență prezența antigenelor specifice celulelor stem: CD44, CD71; CD73 și CD90. În Fig.2 prezentăm rezultatul investigării expresiei antigenului CD90 (**Cluster of Differentiation 90**) sau Thy-1 – o proteină N-glicozilată, ancorată la suprafața celulară printr-o ancoră GPI (glico-fosfatidil inozitol), marker pentru celule stem.

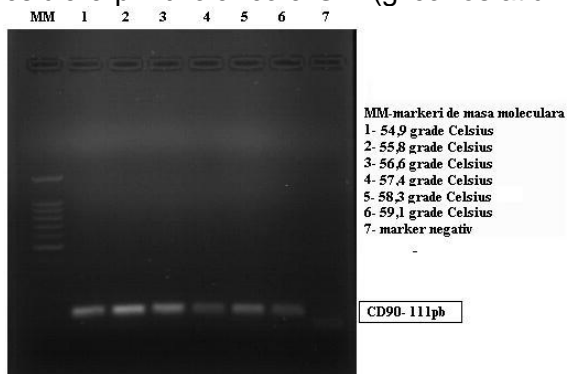


Fig.2. Celulele ADAS exprimă CD90. Produsul de amplificare specific CD90 (111 pb) este obținut la toate temperaturile testate, mai eficient la 55.8°C

Prezența unor antigene de suprafață tipice pentru celulele ADAS a fost investigată și prin studii de imunofluorescență. Celulele au fost însămânțate la o densitate inițială de  $1.5 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>, iar după 24 și 48 ore de cultivare probele au fost fixate cu metanol, iar membrana celulară a fost permeabilizată prin tratare cu 2% BSA și 0.1% Triton x100. Marcarea s-a realizat prin incubare peste noapte cu anticorpi primari anti-CD diluați corespunzător, spălare, tratare cu anticorpi secundari cuplați cu FITC sau TRITC după caz TRITC (Santa-Cruz) și din nou spălare. Pentru evidențierea nucleilor s-a realizat colorația cu DAPI (2 μg/ml în PBS), 15 minute la temperatura camerei.

Aceste studii au confirmat prezența antigenelor de suprafață CD44 (Fig.3), CD73 și CD90 și lipsa antigenului CD34.

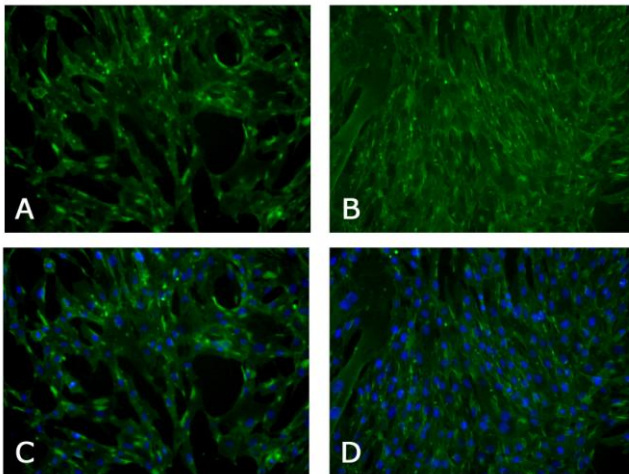


Fig.3. Evidențierea prin imunofluorescență a antigenelor CD44 pe suprafața celulelor ADAS dintr-o cultură de 24 ore (A,C) și de 48 ore (B,D). Colorație FITC (A,B). Colorație dublă FITC+DAPI (C,D). Mărire  $\times 10$ .

Prezența markerilor de suprafață CD44, CD73 și CD90 a fost confirmată și prin studii Western Blotting (lizate celulare, electroforeza SDS-PAGE, transfer pe membrana de celuloză, complexe antigen-anticorp localizare cu Kitul Chromogenic Western Breeze (Invitrogen – cod WB7105)).

Mai multe grupuri [6- 12] au examinat fenotipul suprafeței celulelor ADAS izolate de la om și alte specii. Au fost observate modificări în profilul expresiei în funcție de pasajul culturii și aderența la plastic. După cel puțin 2 pasaje, celulele ADAS exprimă molecule de adeziune și receptor (CD 44 hialuronat, CD71 transferina) caracteristice, enzime de suprafață (CD 73 5'-ectonucleaza), proteine ale ECM (CD 90 Thy1) și ale citoscheletului ( $\alpha$ -actina musculaturii netede, vimentina), proteine asociate cu fenotipul celulelor stromale (CD29, CD44, CD90, CD166) [5]. Imunofenotipul suprafeței celulelor ADAS este asemănător cu cel al celulelor MSC derivate din măduva osoasă [13].

### **Inducția diferențierii adipogenice în sistem 2-D în prezența unor factori adipogenici, monitorizarea procesului și identificarea markerilor specifici adipocitelor (activitatea 2.7)**

Diferențierea adipocitelor este un proces complex care deși a fost intens studiat există încă multe aspecte neelucidate, deși disfuncții la acest nivel au fost corelate cu diabetul de tip II, sindromul metabolic, etc. Culturile de preadipocite *in vitro* recapitulează majoritatea evenimentelor care conduc la formarea adipocitului *in vivo* și permit “disecarea” acestor mecanisme la nivel celular și molecular. Cele mai multe studii există pe culturi de preadipocite izolate de la rozătoare, iar adipocitele de la om și de la rozătoare prezintă diferențe specie-specifice. Culturile de celule ADAS izolate din lipoaspirate oferă un model de studiu *in vitro* a diferențierii adipogenice la om, putând oferi informații privind mecanismele fiziologice și patofiziologice ce pot pune bazele unor strategii terapeutice pentru tratarea obezității și maladiilor corelate.

În studiul nostru celulele ADAS au fost însămânțate, iar după 3 zile de cultivare au ajuns la confluență, iar mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu de diferențiere. S-au utilizat patru medii de diferențiere: **MD<sub>0</sub>**, cumparat ATCC cod 7073131 (menținut 15 zile, împospătat la fiecare 3 zile); **MD1** (s-a utilizat rețeta 1 timp de 15 zile, împospătat la fiecare 3 zile); **MD2** (s-a utilizat rețeta 1 în primele 3 zile și rețeta 2 în următoarele 12 zile) și **MD3** (s-a utilizat rețeta 3 în primele 3 zile, iar în următoarele 12 zile s-a utilizat o rețetă 3 modificată cu tri-iod tironină în loc de triglitazonă. Procesul de diferențiere a fost monitorizat la timpul 0 și după 3, 7 și 11 zile de

tratament prin microscopie în contrast de fază, colorație cu Oil Red O și evidențiere a markerului adipocitar perilipina.

**Colorația cu Oil Red O** (Sigma cod-0625) în izopropanol 60% s-a realizat după fixarea celulelor în metanol (la 4°C). În **Fig. 4** prezentăm microfotografiile obținute în urma colorării cu Oil Red O după 7 zile de diferențiere. Se observă diferențierea celulelor ADAS în adipocite încă din ziua 3 prin acumularea granulelor lipidice în citoplasmă, în special în jurul nucleului.

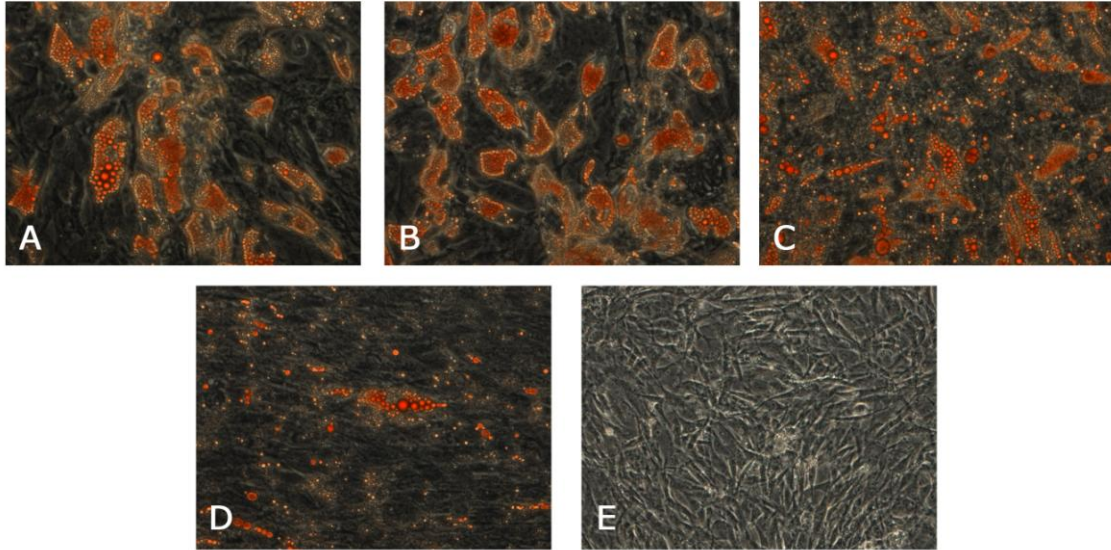


Fig.4. Micrografiile culturilor incubate 7 zile cu medii de diferențiere MDo (A), MD1 (B), MD 2 (C) și MD 3 (D) la  $\times 20$ , pecum și a culturii la timp 0 (e)  $\times 10$  – marcarea cu Oil Red O.

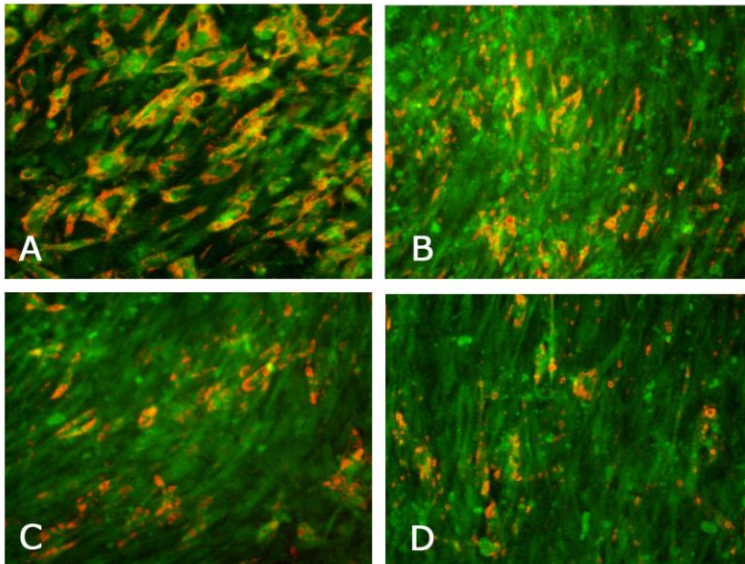


Fig. 5. Micrografiile culturilor incubate 7 zile cu medii de diferențiere MDo (A), MD1 (B), MD2 (C) și MD3 (D) la  $\times 16$  – dublă marcarea fluorescentă pentru perilipină (roșu) și actină (verde)

**Perilipina** denumită și proteina asociată picăturilor de lipide sau PLIN este un reglator important al stocării lipidelor, expresia ei fiind crescută la persoanele obeze. Noi am monitorizat diferențierea celulelor ADAS prin evidențierea perilipinei după marcarea fluorescentă cu anticorpi anti perilipina (Santa Cruz, sc-67164 de iepure) și anticorpi secundari anti-iepure

cuplați cu TRITC (Santa Cruz, sc-2091) diluați corespunzător. În acest experiment s-au marcat și fibrele de actină (Fig. 5) cu faloidină-FITC (Sigma), precum și nucleii cu DAPI.

Rezultatele studiilor de diferențiere adipogenică au fost comparate cu experimente similare realizate pe linia de preadipocite 3T3-L1 de la șoarece. Studiile noastre privind diferențierea celulelor ADAS arată că toate mediile testate permit diferențierea adipogenică a celulelor ADAS; mediile elaborate de noi MD1-MD3 produc o întârziere a diferențierii, ceea ce este un factor pozitiv pentru experimentele de inginerie tisulară. Dintre mediile propuse de noi mediul MD2 corespunde cerințelor acestui proiect. Având în vedere că în Etapa 2 (2011) ne-am propus brevetarea mediului de diferențiere se vor realiza și studii cantitative RT-PCR, precum și evaluarea factorilor de transcripție adipogenici PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ) și C/EBP $\gamma$  (*CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$* ).

### Bibliografie

1. Drury, JL, Moonney, DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffolds design variable and applications, *Biomaterials*. 2003; 24: 4337-4351.
2. Mansbridge, J, Liu, K, Patch, R, Symons, K, Pinney, E. Three dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: Metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng.*, 1998; 4: 403-414.
3. Rowley, JA, Madlambayan, G, Mooney, DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 1999; 20: 45-53.
4. Huselstein, C, de Isla, N, Kolopp-Sarda, MN, Kerdjoudj, H, Muller, S, Stoltz, JF. Influence of mechanical stress on cell viability. *Biorheology*, 2006; 43: 371-375.
5. Gimble, JM, Katz, AJ, Bunnell, BA, Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine, *Circulation Research*. 2007;100:1249-1260
6. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001; 189: 54–63
7. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 4279–4295
8. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004; 6: 7–14.
9. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hadas) cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 412–423.
10. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Halvorsen YD, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006; 24: 1245–1253.
11. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006; 24: 376–385
12. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006; 208: 64–76.
13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143–147