

Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo Em Cardiomiócitos

Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes

Pablo Herthel Carvalho², Ana Paula Falci Daibert¹, Betânia Souza Monteiro³, Bárbara Silva Okano¹, Juliana Lott Carvalho², Daise Nunes Queiroz da Cunha¹, Lukiya Silva Campos Favarato¹, Vanessa Guedes Pereira¹, Luis Eugênio Franklin Augusto¹, Ricardo Junqueira Del Carlo¹

Universidade Federal de Viçosa¹, Viçosa; Universidade Federal de Minas Gerais², Belo Horizonte, MG; Universidade de Vila Velha³, Vila Velha, ES, Brasil

Resumo

Fundamento: O potencial de renovação e proliferação dos cardiomiócitos, *in vivo*, é pequeno, e por isso, o músculo cardíaco apresenta limitada capacidade de repor células perdidas. Na tentativa de minimizar os danos oriundos de lesões hipóxico-ischêmicas e daquelas que acometem o sistema de condução do coração, a terapia celular com células-tronco mesenquimais (MSC) vem sendo utilizada, inclusive com cardiomiócitos diferenciados a partir de MSC.

Objetivo: O presente trabalho comparou três protocolos distintos de indução de diferenciação objetivando a sugestão de um método viável para a diferenciação de maior número de células funcionais que expressem fenótipo cardiomiogênico.

Métodos: Culturas de MSC obtidas de tecido adiposo de ratos jovens da linhagem Lewis transgênicos para proteína verde fluorescente (GFP) foram submetidos a três diferentes meios de diferenciação cardiogênica: Planat-Bérnard, 5-azacitidina e meio Planat-Bérnard + 5-azacitidina e observadas quanto a expressão de marcadores celulares cardíacos.

Resultados: Nos três protocolos utilizados observou-se formação da proteína alfa-actinina sarcomérica no citoesqueleto das células submetidas à diferenciação, expressão de conexina 43 na membrana nuclear e citoplasmática e formação de *gap junctions*, necessárias para a propagação do impulso elétrico no miocárdio, contudo, em nenhum protocolo foi observada contração espontânea das células submetidas à diferenciação cardiogênica.

Conclusão: A indução com 5-azacitidina proporcionou diferenciação celular cardiomiogênica efetiva e similar à encontrada com o meio Planat-Bérnard e, por ser um protocolo mais simples, rápido e com menor custo torna-se o método de eleição. (Arq Bras Cardiol. 2013;100(1):82-89)

Palavras-chave: células-tronco somáticas; 5-azacitidina; terapia celular; cardiomiócitos; diferenciação celular

Abstract

Background: Cardiomyocytes have small potential for renovation and proliferation *in vivo*. Consequently, the heart muscle has limited capacity of self-renewal. Mesenchymal stem cells (MSC) therapy, as well as MSC differentiated into cardiomyocytes, has been used in the attempt to minimize the effects of ischemic-hypoxic lesions and those affecting the electrical conduction system of the heart.

Objective: The present study compared three distinct protocols for induced differentiation of MSC into cardiomyocytes aimed at finding a viable method for producing a large number of functional cells expressing cardiomyogenic phenotype.

Methods: Mesenchymal stem cells were obtained from the adipose tissue of young transgenic Lewis rats expressing green fluorescent protein (GFP), and submitted to three distinct differentiation-inducing media: 1) Planat-Bérnard, 2) 5-azacytidine, and 3) Planat-Bérnard + 5-azacytidine; further, these cells were identified based on the expression of cardiac cell markers.

Results: All three protocols detected the expression of sarcomeric-alpha-actinin protein in the exoskeleton of cells, expression of connexin-43 in the nuclear and cytoplasmic membrane, and formation of gap junctions, which are necessary for electrical impulse propagation in the myocardium. However, no spontaneous cell contraction was observed with any of the tested protocols.

Conclusion: Induction with 5-azacytidine provided an effective cardiomyogenic cellular differentiation similar to that obtained with Planat-Bérnard media. Therefore, 5-azacytidine was the method of choice for being the simplest, fastest and lowest-cost protocol for cell differentiation. (Arq Bras Cardiol. 2013;100(1):82-89)

Keywords: Somatic stem cells; 5-azacytidine; cellular therapy; cardiomyocytes; cell differentiation.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Ricardo Junqueira Del Carlo •

Av. PH Rolfs, S/N – Departamento de Veterinária - Campus universitário - UFV - CEP 36570-000 – Viçosa, MG, Brasil
E-mail: ricarlo@ufv.br

Recebido em 06/06/12; revisado em 04/08/12; aceito em 15/08/12.

Introdução

O potencial de renovação e proliferação dos cardiomiócitos, *in vivo*, é pequeno, e por isso, o músculo apresenta limitada capacidade de repor as células perdidas mediante as lesões hipóxico-isquêmicas¹ e por lesões que acometem o sistema de condução do coração^{2,3}. Dependendo da extensão destas lesões, os cardiomiócitos necróticos são progressivamente substituídos por tecido fibroblástico, resultando em disfunção contrátil e falência congestiva cardíaca⁴.

Na tentativa de minimizar estes danos cardíacos e como alternativa ao transplante de coração, as terapias celulares têm sido propostas como método reparador de áreas de infarto e restaurador do sistema de condução do impulso⁵. Dentre as células candidatas, as células-tronco mesenquimais (MSC), oriundas de diversas fontes, vem sendo utilizadas devido sua disponibilidade, viabilidade, plasticidade e, recentemente, por serem capazes de expressar fenótipos similares aos cardiomiócitos, em meios específicos de diferenciação^{6,7}.

Valiunas e cols.⁸ e Kehat e cols.² demonstraram, *in vitro*, que as MSC apresentam a habilidade de formar *gap junctions* funcionais e gerar ritmo espontâneo e Plotnikov e cols.⁹ e Potapova e cols.³ demonstraram, *in vivo*, que as células diferenciadas exibem função eletrofisiológica similar às células oriundas do tecido cardíaco, reforçando a expectativa em torno da aplicação terapêutica.

Diferentes protocolos para diferenciação das MSC em cardiomiócitos estão descritos como, por exemplo, estímulos com agentes dimetiladores^{2,6,10-12}, *pool* de fatores de crescimento¹³, co-cultura com cardiomiócitos normais⁷ e inserção de genes específicos⁴. Apesar de resultados satisfatórios, a diferenciação à cardiomiócitos funcionais *in vitro* é ainda questionada, os mecanismos são desconhecidos^{11,14}, apenas uma pequena parcela de MSC apresenta o fenótipo cardiomiogênico e o benefício clínico da reparação cardíaca é limitado¹⁵.

Com o intuito de propor um método viável, o presente trabalho comparou três protocolos distintos de indução da diferenciação de MSC obtidas do tecido adiposo em cardiomiócitos, visando a produção de células para aplicação em modelos pré-clínicos.

Métodos

Animais

O estudo seguiu os padrões estabelecidos no Guia para Cuidados e Uso de Animais de laboratório (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996) e respeitou os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo número 14/2011.

Para a experimentação *in vitro* foram utilizados três ratos machos, de 4 semanas de vida, da linhagem Lewis, transgênicos para proteína verde fluorescente (LEW-Tg eGFP F455/Rrrc). As alterações genéticas foram caracterizadas pela

presença do vetor lentivirus, contendo o gene eGFP sob o controle do promotor de ubiquitina C.

Cultura celular

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara anestésica, com inalação passiva de isoflurano até a sobredosagem. Foi realizada tricotomia do abdômen e membros pélvicos e em seguida os animais foram transferidos para capela de fluxo horizontal. Foi realizada incisão abdominal na linha branca, exposição do peritônio e remoção da gordura inguinal. O material coletado foi cortado em pequenos pedaços, lavado duas vezes em solução de PBS 0,15M, pH = 7,2, com penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA - Gibco, Paisley, UK) e armazenado em solução de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e PSA.

Realizou-se digestão enzimática do tecido adiposo com solução de colagenase do tipo I (Sigma, St Louis MO, USA), por 60 minutos, em estufa a 37°C, 5% de CO₂, agitado a cada 15 minutos. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em DMEM completo após descarte do sobrenadante. As células foram plaqueadas, inicialmente, na concentração de 5x10⁶ células em frascos de cultura celular de 75 mm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

As células foram mantidas em cultura com repiques sucessivos até quarta passagem para serem submetidas à caracterização celular por citometria e/ou até a quinta passagem, quando, então, foram submetidas às etapas de diferenciação.

Caracterização celular

As células da quarta passagem, derivadas de tecido adiposo, foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular CD 73 (anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse - AbCam Cambridge, Massachusetts, EUA), CD 54 (anti-CD54 clone 1A29 mouse - AbCam), CD 90 (anti-CD90 clone Ox-7 mouse - AbCam) e CD 45 (anti-CD45 clone 69 mouse - BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA), utilizando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

Diferenciação osteogênica

Após a quinta passagem, as células aderentes foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas em placa de 6 poços (TPP - Zollstrasse, Trasadingen, Suíça), com lamínulas de 22 mm de diâmetro (Sarstedt), com meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10⁻⁸ mol/mL de dexametasona (Sigma), 5,0 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 10,0 mmol/L de β-glicerofosfato (Sigma) e incubado a 37°C por quatro semanas. No 30º dia as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas pelo método de Von Kossa para observar a deposição de cálcio.

Artigo Original

Diferenciação cardiogênica

As células na quinta passagem foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas na concentração de 1×10^4 células por lamínula, em meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB, em placas de cultivo de seis poços, contendo lamínulas de 22 mm de diâmetro (Sarstedt), e incubadas em estufa.

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com solução de PBS e as placas foram submetidas a protocolos de diferenciação cardiogênica distintos, conforme a tabela 1. O experimento foi realizado em triplicata.

Imunofluorescência

Após o período de indução com os protocolos testados, todas as placas foram lavadas com solução de PBS e as células fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,25% (Roche, Alemanha) em PBS por 10 minutos, seguido de três novas lavagens com PBS. Após o bloqueio com 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 5% de soro de cabra diluídos em PBS, as lamínulas contendo as células tratadas foram incubadas individualmente com os anticorpos primários por 2 horas em câmara úmida refrigerada (4°C).

Os anticorpos utilizados para detecção da diferenciação cardiogênica foram: anticorpo IgG de coelho anti- α -actinina sarcomérica, diluição 1:100 (AbCam) e anticorpo IgG de coelho anti-conexina 43, clone GJA1, diluição 1:400 (CX-43 - AbCam). Os anticorpos secundários utilizados foram: anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 555 (Invitrogen, Califórnia, EUA) e anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 555 (Invitrogen). O núcleo foi marcado com Hoescht (0,2 μ g/mL). As lamínulas foram montadas em lâminas com uma gota de Hydromount (National Diagnostics, USA) e protegidas da luz.

As amostras foram analisadas em microscópio confocal Zeiss 510 Meta e software LSM Image Browser (Carl Zeiss, Stuttgart, Alemanha). Como controles negativos, foram utilizadas as células incubadas apenas com o anticorpo secundário, para cada uma das placas testadas. As imagens foram visualizadas e capturadas separadamente em filtros de 420 a 460 nm (azul), 510 a 560 nm (verde) e 560 a 660 nm (vermelho).

Resultados

Cultura celular

Nos primeiros dois dias de cultura, observou-se que o tecido adiposo propiciou uma cultura heterogênea, composta por células arredondadas, não aderentes e micelas lipídicas no sobrenadante da cultura. A partir do décimo dia, a população celular estava mais homogênea, com predominância das células aderentes de morfologia fibroblastóide, organizadas em colônias.

As trocas do meio de cultura propiciaram a remoção das células não aderentes e das micelas lipídicas e, mediante a visualização de 80% de confluência celular nas placas, as células foram tripsinizadas e uma nova subcultura foi estabelecida.

Durante todo o período de cultivo, as células aderentes mantiveram-se fenotipicamente estáveis sem sinais de senescência.

Caracterização celular

O ensaio de citometria de fluxo realizado com as células eGFP derivadas de tecido adiposo demonstrou que cerca de 87,2% das células expressaram CD90, 92,1% CD73, 93,2% CD54 e, aproximadamente, 2,17% expressaram CD45 (figura 1). O conjunto de marcadores utilizados permitiu inferir que a população celular isolada e cultivada era homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoiética.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo submetidos à diferenciação em cardiomiócitos.

Grupo	Nome	Composição	Protocolo
G1	Controle	Meio DMEM + SFB10%	Mantido constantemente no mesmo meio, alterado a cada 3 ou 4 dias.
G2	Planat-Bérnard*	Meio DMEM + SFB 15% + albumina de soro bovino 1% + 10^{-4} mol/L de 2-mercaptoetanol + 2 mmol/L de L-glutamina + 10 μ g/mL de insulina humana recombinante + 200 μ g/mL de transferrina humana + 10 ng/mL de IL-3 recombinante + 10 ng/mL de IL-6 recombinante + 50 ng/mL de fator recombinante de células-tronco mesenquimais (fator recombinante de células estaminais).	Mantido constantemente no mesmo meio, alterado a cada 3 ou 4 dias.
G3	Planat-Bérnard + 5-azacitidina	G2 + 5 μ M 5-Aza	Mantido em meio Planat-Bérnard com 5-Aza por 24 horas, e, em seguida, mantido em meio Planat-Bérnard.
G4	5-azacitidina	Meio DMEM + SFB 10% + 5 μ M 5-Aza	Mantido no meio durante 24 horas, em seguida, em DMEM completo.

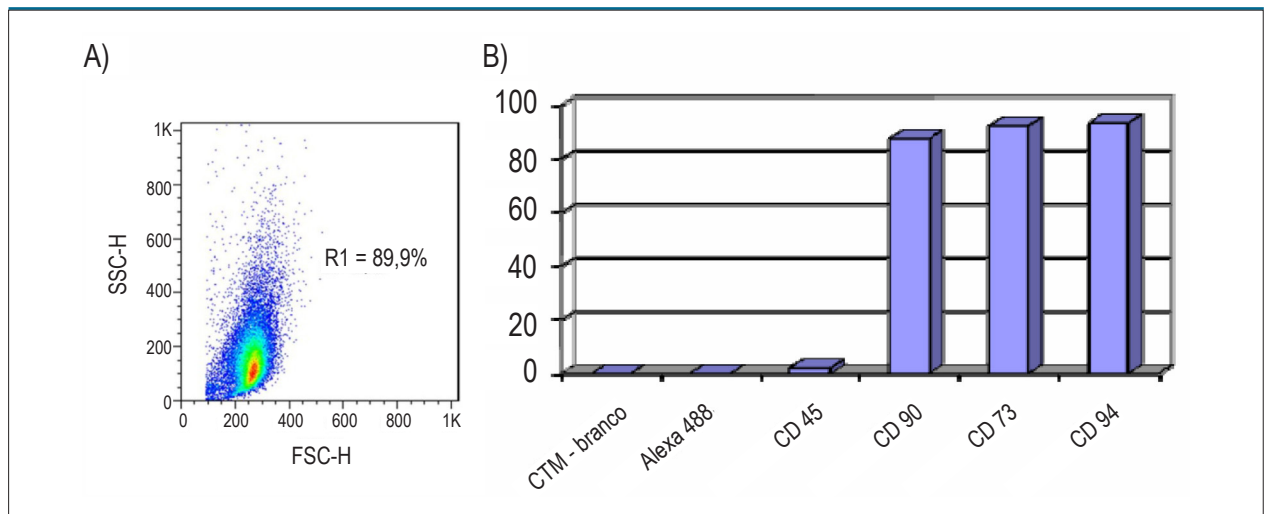


Figura 1 – Avaliação fenotípica das MSC do tecido adiposo de ratos Lewis eGFP, por citometria de fluxo. A) Gráfico de granulidade (SSC) versus tamanho (FSC) demonstrando a população celular selecionada para estudo (R1). B) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada (R1), com os anticorpos anti-CD45, anti-CD54, anti-CD73 e anti-CD90.

Diferenciação osteogênica

As células submetidas à diferenciação osteogênica apresentaram pontos de calcificação da matriz a partir do décimo dia após indução da diferenciação. As células mudaram da aparência fibroblástóide, alongada, para uma forma mais arredondada, assemelhando-se à células da linhagem óssea. A presença da matriz extracelular rica em cálcio, evidenciada pela observação de nódulos de mineralização amarronzados ou negros na coloração de Von Kossa, visualizada no 30º dia, comprovou a diferenciação em osteoblastos das MSC cultivadas. Esses nódulos não foram observados em nenhum período no controle, que também não apresentou modificação morfológica, mantendo a característica fibroblástóide.

Diferenciação cardiogênica

As células do G2 submetidas aos protocolos de diferenciação não apresentaram alterações morfológicas em relação ao controle (G1) durante o período avaliado (15 dias), mantendo o formato fibroblástóide e a aderência à placa. Nos grupos G3 e G4 verificou-se aumento do tamanho das células em relação ao controle, de até 20% da área celular e as células fibroblástóides apresentavam-se ligeiramente arredondadas.

Não foram observadas células binucleadas e nem contração espontânea das células submetidas à diferenciação cardiogênica, independentemente do protocolo.

Nos grupos que foi utilizada a 5-azacitidina (G3 e G4), após as primeiras 24 horas das células nos meios de diferenciação, verificou-se 30% de morte celular das células que estavam aderidas. Após esse período, o meio foi trocado conforme descrito no protocolo, as células mortas foram removidas e após cinco dias as células diferenciadas que permaneceram em cultura, expandiram-se em número.

Constatou-se que nos três protocolos testados, as MSC apresentaram expressão de alfa-actinina sarcomérica e conexina

43, modificações que não ocorreram no grupo controle (Figura 2 e Figura 3). Foi observada formação da proteína alfa-actinina sarcomérica no citoesqueleto das células submetidas à diferenciação, proteína típica de células musculares cardíacas. A expressão de conexina 43 ocorreu na membrana nuclear e citoplasmática, sobretudo nos pontos de interação com células vizinhas, demonstrando nestas, formação de *gap junctions*, necessárias para a propagação do impulso elétrico no miocárdio.

Discussão

As células aderentes observadas na fase inicial do cultivo não representam exclusivamente MSC, pois fibroblastos, macrófagos e algumas células da linhagem hematopoética podem aderir à placa de cultivo e crescer com características morfológicas semelhantes à MSC^{16,17}, portanto a propriedade de aderência à placa de cultura não é suficiente para considerar a população celular purificada como MSC¹⁸, ressaltando a importância do cumprimento das demais etapas de caracterização.

A caracterização fenotípica das MSC do tecido adiposo de ratos Lewis transgênicos para eGFP demonstrou ausência de marcação para CD45 em 98% das células, e expressão de CD73, CD54 e CD90 em 92,1; 93,2 e 87,2% das células, respectivamente. A caracterização fenotípica das células antes da diferenciação celular informa o grau de pureza da cultura, pois outros tipos celulares encontrados na medula óssea e no tecido adiposo podem apresentar características morfológicas similares às MSC *in vitro*, como células hematopoéticas^{19,20} e fibroblastos²¹. As células hematopoéticas expressam, dentre outras moléculas, CD45^{20,22} que também pode ser expressa em fibroblastos²¹. A molécula CD73 pode ser expressa tanto em fibroblastos quanto em MSC²¹, no entanto as moléculas CD90²⁰ e CD54²³ expressas em mais de 90% das células deste estudo, são exclusivas das MSC, não sendo expressas em fibroblastos e células hematopoéticas. Assim, a caracterização fenotípica confirmou a pureza de mais de 90% da cultura.

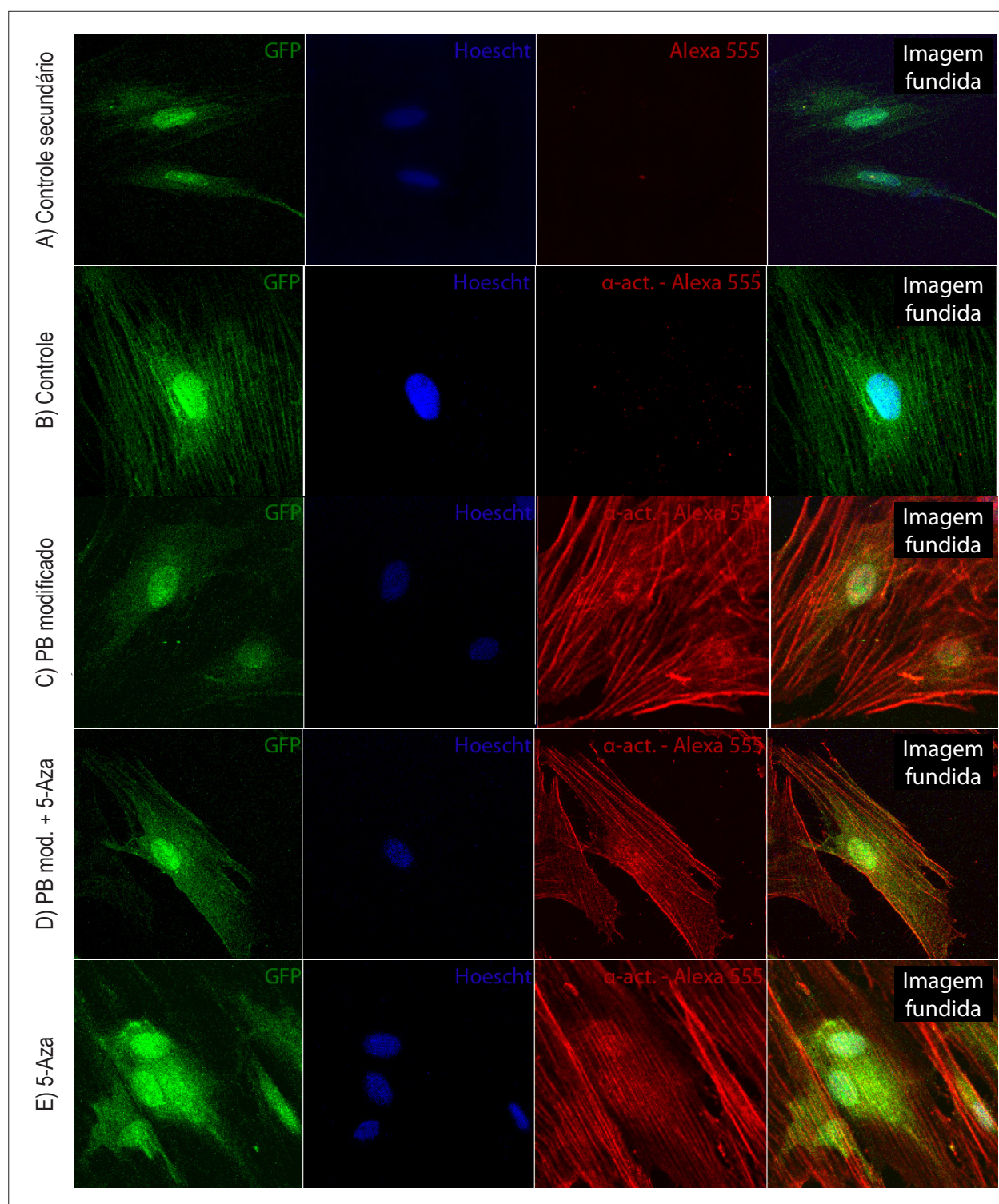


Figura 2 – Análise por imunofluorescência de MSC derivadas do tecido adiposo. O resultado representa a expressão da alfa-actinina sarcomérica nas MSC submetidas a três protocolos de diferenciação cardiogênica (C, D, e E). As MSC indiferenciadas (controles) não apresentam expressão da proteína avaliada (A e B). O painel A mostra o teste de anticorpo secundário, o que demonstra a ausência de reação não específica com MSC. O núcleo é marcado com Hoechst (azul), as MSC em verde (GFP), e o anticorpo testado (alfa-actinina anti-sarcomérica) em vermelho (Alexa 555). O painel no canto direito ilustra a superposição de imagens individualmente obtidas com cada filtro (fundidas). Objetiva: Imersão em óleo 63x.

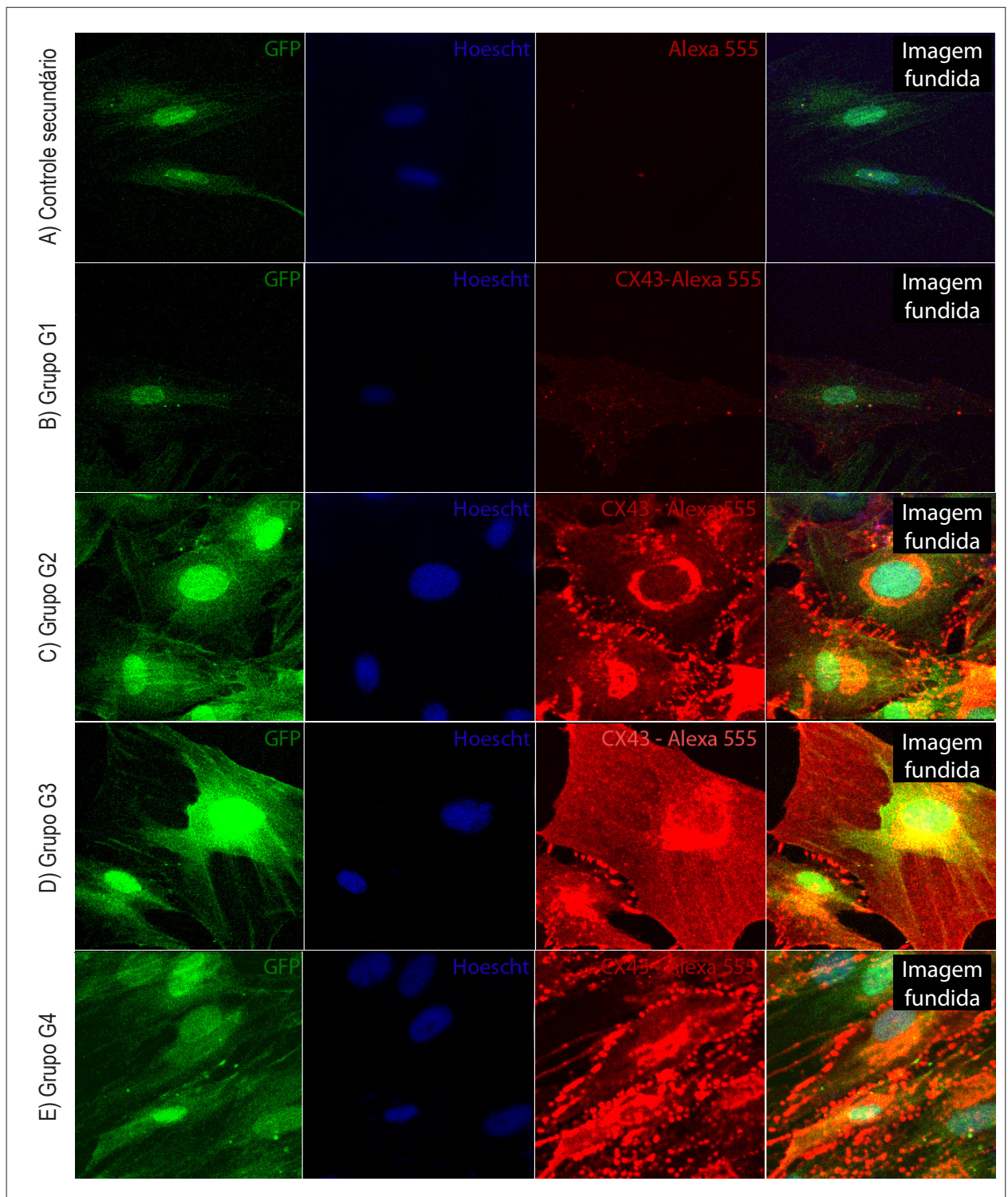


Figura 3 – Análise por imunofluorescência de MSC derivadas do tecido adiposo. O resultado representa a expressão da conexina 43 nas MSC submetidas a três protocolos de diferenciação cardiogênica (C, D e E). As MSC indiferenciadas (controles) não apresentam expressão da proteína avaliada (A e B). O painel A mostra o teste de anticorpo secundário, o que demonstra a ausência de reação não específica com MSC. O núcleo é marcado com Hoechst (azul), as MSC em verde (GFP), e o anticorpo testado (CX43) em vermelho (Alexa 555). O painel no canto direito ilustra a superposição de imagens individualmente obtidas com cada filtro (fundidas).
Objetiva: Imersão em óleo 63x.

Artigo Original

A capacidade de diferenciação osteogênica, exibida pelas células cultivadas do tecido adiposo, reafirma que os tipos celulares cultivados são MSC, pois apenas elas apresentam capacidade de diferenciação osteogênica^{19,20,24}. As MSC mudaram da aparência fibroblastóide para uma forma arredondada, morfológicamente semelhante a osteoblastos^{22,25,26} e foi observada a formação de nódulos de mineralização, comprovando a diferenciação das células em osteoblastos²⁵⁻²⁸.

A 5-Azacidina, o meio de Planat-Bérnard e a associação dos dois, foram capazes de induzir modificações moleculares nas MSC do tecido adiposo de ratos Lewis transgênicos eGFP, gerando células capazes de expressar marcadores cardíacos, semelhantes a cardiomiócitos, similar ao encontrado por Planat-Bérnard e cols.¹³, Martin-Rendon e cols.¹⁵ e Bianco e cols.¹⁹.

Os grupos G2, G3 e G4 apresentaram expressão de conexina 43 e alfa-actinina sarcomérica, marcadores moleculares de cardiomiócitos, similar ao observado por outros autores^{2,6,29,30}.

Martin-Rendon e cols.¹⁵, demonstraram que a 5-Azacidina pode ser utilizada na concentração de 5 μ M ou 10 μ M sem apresentar diferença na indução da diferenciação das MSC em cardiomiócitos. Adicionalmente, diferentes tempos de exposição à 5-Azacidina (24h, 24h-3 dias-24h, 3 dias, ou 1 semana) não promoveram incremento no número de células diferenciadas¹⁵, além de aumentar o efeito genotóxico deste agente dimetilador, recomendando-se utilizar o menor tempo e a menor concentração de 5-Azacidina para induzir a diferenciação, diminuindo também, os custos e o tempo para a obtenção das células desejadas. A concentração de 3 μ M de 5-Aza também induziu diferenciação cardiogênica em MSC^{10,31}.

A única alteração morfológica exibida pelas células dos grupos G3 e G4 foi o aumento do tamanho das células, como descrito previamente por Makino e cols.⁶ que utilizaram a 5-Azacidina. Estes achados contradizem os achados relatados por Haghani e cols.²⁹ que visualizaram células com morfologia arredondada, maiores que as células fibroblastóides inicialmente presentes na cultura, e células binucleadas. O grupo G2 não apresentou modificações morfológicas evidentes.

Não foi observada contração espontânea em nenhum grupo de tratamento, ao contrário do descrito previamente ao se utilizar a 5-Aza^{6,15} e o meio de Planat-Bérnard¹³. Esse resultado corrobora o descrito por Balana e cols.³² que observaram poucas células contráteis, *in vitro*, ao utilizar a 5-Aza em MSC humanas derivadas da medula óssea e Martin-Rendon e cols.¹⁵ que demonstraram que a expressão de marcadores miogênicos ocorre em aproximadamente 0,07% das MSC tratadas com 5-Aza e, portanto, contração espontânea nem sempre é visualizada.

Embora Planat-Bérnard e cols.¹³ tenham demonstrado que a exposição à 5-Aza foi necessária para induzir contração, no grupo G3 não foram observadas células com contração espontânea. Contudo, conforme as afirmações de Valiunas e cols.^{4,8}, a ausência de contração espontânea não descarta a possibilidade de utilização destas células na terapia para afecções cardíacas, pois os cardiomiócitos diferenciados a

partir das MSC apresentaram modificações moleculares, como a expressão da alfa-actinina sarcomérica e conexina 43, que permitem a contração celular, propagação do impulso elétrico para as outras células do miocárdio e demonstram a existência de *gap junctions* nas células tratadas.

Os dados obtidos, *in vivo*, por Toma e cols.³⁰ e Dai e cols.³³ demonstraram diferenciação das MSC transplantadas à cardiomiócitos funcionais, discordando do observado *in vitro*, no qual não se observou a contração voluntária. Tal fato sugere que o tratamento com agentes dimetiladores (5-Aza) ou outros métodos de indução pode não ser suficiente para diferenciar as MSC adultas a linhagem cardiogênica e que, pode haver outros fatores fornecidos pelo “nicho cardíaco” que influenciam o evento de diferenciação *in vivo*^{14,15}.

A indução da diferenciação com a 5-azacidina é um método mais simples e com menor custo quando comparado ao meio desenvolvido por Planat-Bérnard e cols.¹³. Adicionalmente, os mecanismos de ação da 5-azacidina são mais conhecidos^{11,12} e sua utilização na pesquisa é mais difundida^{6,10,15,34}.

Por apresentarem modificações moleculares semelhantes ao cardiomiócito, mas não demonstrar atividade funcional espontânea, admite-se que as MSC foram pré-induzidas à cardiomiócitos, apresentando características celulares para executar as funções de um cardiomiócito¹¹ e, provavelmente, irá acelerar sua ação na terapia de afecções cardíacas em relação à utilização de MSC indiferenciadas. Faz-se necessário a avaliação destas células *in vivo*, para comprovar sua funcionalidade no miocárdio, comprovar a diferenciação à cardiomiócitos e a propagação sincronizada dos estímulos elétricos fisiológicos.

Conclusão

Concluiu-se que MSC do tecido adiposo submetidas aos três diferentes protocolos de diferenciação cardiogênica foram pré-induzidas às células diferenciadas que expressaram marcadores de superfície similares à cardiomiócitos e apresentaram estruturas celulares como *gap junctions* e alfa-actinina sarcomérica, necessárias a condução do impulso elétrico e contração. A indução com 5-azacidina é um método que proporciona diferenciação celular cardiomiogênica efetiva e similar à encontrada com o meio desenvolvido por Planat-Bérnard, e por ser um protocolo mais simples, rápido e com menor custo torna-se o protocolo de eleição.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq e FAPEMIG.

Vinculação Acadêmica

Este artigo faz parte da tese de doutorado de Ana Paula Falci Daibert pela Universidade Federal de Viçosa.

Referências

- Gallo P, Peschle C, Condorelli G. Sources of cardiomyocytes for stem cell therapy: an update. *Pediatr Res*. 2006;59(4 Pt 2):79R-83R.
- Kehat I, Khimivich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004;22(10):1282-9.
- Potapova I, Plotnikov A, Zhongju L, Danilo P, Valiunas V, Qu J, et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res*. 2004;94(7):952-9.
- Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potopova I, Zuckerman I, Walcott B, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol*. 2004;555(Pt 3):617-26.
- Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, Sun J, Smart FW, Van Meter CH Jr, et al. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant*. 1998;7(3):239-46.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
- Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, Shan Z, Yang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):295-303.
- Valiunas V, Weingart R, Brink PR. Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43. *Cir Res*. 2000;86(2):E42-9.
- Plotnikov NA, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L, et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation*. 2004;109(4):506-12.
- Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol*. 2002;325(10):1027-38.
- Burlacu A. Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview. *Arch Physiol Biochem*. 2006;112(4-5):260-4.
- Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, Titorencu I, Dragan E, Jinga V, et al. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Eur J Cell Biol*. 2008;87(3):173-84.
- Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo J-M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004;94(2):223-9.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):389-98.
- Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes *in vitro* at high frequencies. *Vox Sang*. 2008;95(2):137-48.
- Schrepfer S, Deuse T, Lange C, Katzenberg R, Reichenspurner H, Robbins RC, et al. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(1):105-7.
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LM, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(supl. 1):25-35.
- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variation in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72(4):570-85.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44(4):215-30.
- Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(1):297-303.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(9):1179-83.
- Paniushin OV, Domaratskaia EI, Starostin VI. [Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2006;(1):6-25.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-84.
- Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174:249-82.
- Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashi U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*. 2008;19(4):320-5.
- Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med*. 2009;234(1):1-9.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Murzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(25):8692-7.
- Haghani K, Bakhtiyari S, Nouri AM. *In vitro* study of the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells. *Mol Cell Biochem*. 2012;361(1-2):315-20.
- Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res*. 2006;16(12):949-60.
- Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short-and long-term effects. *Circulation*. 2005;112(2):214-23.
- Ren X, Pu J, Zhang S, Meng L, Wang F. Cardiac atrioventricular conduction improved by autologous transplantation of mesenchymal stem cells in canine atrioventricular block models. *J Geriatr Cardiol*. 2007;4(4):238-43.