

O PAPEL DA HIF-1 α NA DIFERENCIAÇÃO ANGIOGÊNICA UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

MARIANE DUTRA JOANOL¹; CAROLINA SAMPAIO DE AZEVEDO²; TIAGO MACHADO DA SILVA³; WELLINGTON LUIZ OLIVEIRA DA ROSA⁴; ADRIANA FERNANDES DA SILVA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – marianejoanol@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolsampaio_a@live.com

³Universidade Federal de Pelotas – tiagomachado91@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – wellington_xy@outlook.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – adrisilvapiva@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Estudos baseados na engenharia tecidual foram desenvolvidos utilizando células-tronco mesenquimais em várias formas de terapias tanto para reparo quanto para regeneração de tecidos e órgãos. As células tronco mesenquimais (MSC) são células multipotentes não hematopoiéticas que residem e podem ser isoladas de diferentes tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, polpa dental, líquido amniótico, cordão umbilical entre outros (ERICES et al., 2000; CAMPAGNOLI et al., 2001; KOGLER et al., 2004). Enquanto isso, a aplicação de condições hipóxicas sobre as células-tronco mesenquimais pode resultar em melhor eficiência na diferenciação pluripotente tanto de células de rato, como de células humanas (YOSHIDA et al. (2009) pela expressão de HIF-1 α .

A HIF-1 α é uma importante molécula de sinalização bioquímica no corpo, e exerce função na proliferação, migração, adesão, sobrevivência, metabolismo, secreção e diferenciação de MSCs, TSAI et al (2011). Assim, condições de hipóxia prolongada podem levar à apoptose, no entanto, o condicionamento sob hipóxia pode também conferir benefícios citoprotetores, pois facilita o desenvolvimento celular, mantém a pluripotência do MSC, induz a diferenciação, regula a sinalização de várias cascatas, como a angiogênese HOCHACHKA et al (1996) em diferentes tipos celulares.

Segundo ARANHA et al., (2010) a regulação da ativação de fatores angiogênicos VEGF, FGFb pelo HIF-1 α em células tronco e fibroblastos, através de estudos demonstraram que, quando estas células eram cultivadas em hipóxia (1% de O₂) houve aumento da expressão do VEGF comparado com células cultivadas em normóxia (21% de O₂). Este estudo foi pioneiro na utilização de células tronco originárias de polpa de dentes permanentes sob a condição de hipóxia para avaliar a expressão de fatores angiogênicos.

Estudos relacionados a hipóxia demonstram que ela está envolvida tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. A hipóxia mostra-se como um fator estimulante para a regeneração e eficácia terapêutica, entretanto, os efeitos do condicionamento hipóxico sobre hMSCs ainda não são claros, especialmente em diferentes tipos de células. Devido a isso, o propósito desta revisão sistemática foi avaliar a influência da hipóxia em células-tronco mesenquimais humanas e o desfecho das mesmas na proliferação de vasos sanguíneos.

2. METODOLOGIA

A revisão foi relatada de acordo com a declaração PRISMA.. A busca de artigos foi realizada em sete bases de dados (PubMed (MedLine), Web of Science, Scopus, Scielo, Ibics, Lilacs e BBO). Para o processo de busca, foram utilizados termos específicos relacionados à hipóxia, células-tronco mesenquimais e diferenciação angiogênica. Para importação dos documentos encontrados nas bases de dados, foi utilizado o software Mendeley (Elsevier, Amsterdam, NL), onde foi feita leitura de título e resumo dos mesmos, bem como a remoção de duplicatas. Após o primeiro processo de triagem, os artigos foram selecionados de acordo com critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. Todos os estudos dos últimos 3 anos que analisaram a condição de hipóxia no delineamento do experimento foram incluídos, bem como estudos *in vitro*, estudos que analisaram o efeito direto ou indireto da hipóxia utilizando células-tronco humanas sobre a produção de vasos sanguíneos. Não foram incluídas teses, dissertações, revisões, relatos de caso, bem como células-tronco provenientes de tecidos ou células tumorais. No processo de extração e análise dos dados os artigos foram lidos na íntegra e as seguintes informações de interesse foram tabuladas no formato de planilha do software Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA): tipo de estudo, ano de publicação, país do autor, origem anatômica da célula utilizada, e metodologia de utilização da hipóxia (porcentagem de hipóxia, tempo de indução de hipóxia, e objetivo da hipóxia). Os principais achados de cada estudo também entraram no processo de tabulação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 3326 documentos potencialmente relevantes foram encontrados nas buscas nas bases de dados. Após triagem por título e resumo 250 estudos foram submetidos a análise qualitativa e ao final 18 estudos foram analisados até o dado momento. Para essa análise foram tabulados itens de interesse como diferenciação celular, viabilidade/proliferação e migração.

A angiogênese foi avaliada nesses 18 estudos, envolvendo todos os locais (sítios) celulares. Na maioria deles houve estimulação da angiogênese sob hipóxia, e este efeito foi visto indiretamente pelos fatores de crescimento e citocinas que foram expressas por hMSCs. Do total, cinco estudos que avaliaram a angiogênese direta foram capazes de demonstrar a formação de estruturas tubulares e pré-vascularização em placas e *scaffolds*. Apenas dois estudos encontraram um resultado similar entre hipóxia e normóxia e um estudo com melhor resultado da angiogênese sob normóxia.

Um sistema vascular de bom funcionamento é vital, pois assegura a troca de oxigênio, o fornecimento de nutrientes e a remoção de resíduos para todos os órgãos CHEN et al (2014). Em estágios de desenvolvimento posteriores e na vida adulta, os novos vasos sanguíneos são principalmente formados por angiogênese, que é o surgimento de novos vasos dos já existentes. Ambos os processos são controlados por fatores de crescimento angiogênicos. Na terapia com isquemia, a angiogênese é crucial. O efeito das condições de cultura hipóxica pode diminuir o tempo de expansão celular e induzir diferenciação de BMSC quando comparado

com protocolos padrão e mais citocinas associadas à angiogênese são liberadas, incluindo o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), VEGF, interleucina-6 (IL-6), IL-8. Entre todas as moléculas que participam da angiogênese, o VEGF é particularmente relevante, uma vez que modula a função das células vasculares e não vasculares e promove cada etapa da angiogênese, em condições fisiológicas e patológicas, em condições de hipóxia se tem o aumento da expressão de VEGF porque em baixas tensões de oxigênio a transcrição de genes é ativada e a estabilização do RNA mensageiro também garantindo assim, um aumento da expressão desse fator de crescimento endotelial vascular. A ativação da angiogênese é um mecanismo potencial para contrabalançar a hipóxia tecidual. No estresse oxidativo, a angiogênese é induzida pela sinalização de VEGF. A ação angiogênica do VEGF envolve adicionalmente um efeito anti-apoptótico que promove a sobrevivência celular, observando os resultados encontrados na literatura, o potencial angiogênico avaliado pela formação de tubo endotelial foi consistentemente superior, com tubos endoteliais bem desenvolvidos, pontos de ramificação e formação de rede de interconexão.

A hipóxia pode ser considerada uma força motriz comum, dado que em ambos os casos o tecido em crescimento experimenta um momento de privação de oxigênio como resultado de uma difusão inadequada. As células hipóxicas secretam fatores proangiogênicos que agem em células endoteliais vizinhas para induzir angiogênese de dentes artificiais ou estimulam a invasão de precursores de células endoteliais na papila dental durante o desenvolvimento dentário.

A expressão é dependente da variação da tensão de oxigênio, quando há hipoxia, a transcrição de HIF-1 α regula a expressão de vários fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), FGF, fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento transformantes (TGFs), insulina- como fator de crescimento (IGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre eles também Oct-4, Sox2 e Nanog, que são fatores de transcrição essenciais para a manutenção da pluripotência. Quando novos vasos sanguíneos são formados e a homeostase de oxigênio é restaurada, a expressão de HIF-1 α diminui, seguida de uma prisão de angiogênese. O condicionamento hipóxico nos níveis de oxigênio entre 1 % - 5% realizaram uma regulação da proliferação observada pela estimulação da angiogênese sob hipóxia, principalmente no efeito indireto. Esses fatores de crescimento e citocinas expressados por hmsc's, principalmente o VEGF foram comprovados nos nossos resultados a partir dos relatos na literatura de que as culturas de células in vitro houveram formação de estruturas tubulares e pré-vascularização tanto em placas como em *scaffolds*. A hipóxia é, portanto, um importante regulador da angiogênese, particularmente estimulando a atividade angiogênica indireta das células.

4. CONCLUSÕES

Há evidências na literatura de que o condicionamento na hipóxia pode melhorar o metabolismo e a expressão de células tronco mesenquimais. Os resultados sugerem que a hipóxia pode ser um importante regulador da angiogênese, sendo que o uso de diferentes células mesenquimais em hipóxia in

vitro, de modo a mimetizar o ambiente natural de seus nichos, pode resultar em maior desempenho funcional para a estimulação angiogênica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANHA, A. MF, et al. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. **Joe Research Biology**, Michigan, v. 36, outub. 2010, p. 1633–7.
- CHEN, L., et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. China, abr. 2014. **Journal PLOS One**.
- HICKLIN D. J., ELLIS L. M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. New York, fev. 2005. **Journal of clinical oncology**. V. 23, p. 1011- 1027.
- HOCHACHKA PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **ProcNatlAcadScience U S A** 1996;93(18):9493–8.
- LIMA, E. G., et al. The Beneficial Effect of Delayed Compressive Loading on Tissue-Engineered Cartilage Constructs Cultured with TGF- β 3 2009;15(9):1025–33.
- RAJENDRAN, N. et al. Differential response of human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to hypoxia – reoxygenation injury. **Mol Cell Biochem**, New York, 425(1):139–53, nov. 2016.
- REISER, J. et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. **Expert OpinBiolTher**, New Orleans, 2005;5(12), p. 1571–84.
- TSAI C. C., et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. **Blood** 2011;117(2):459–69.
- YOSHIDA, Yoshinori et al. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 5, n. 3, p. 237-241, 2009.