

Avaliação de células-tronco mesenquimais provenientes de camundongos NOD

Rosa PM • Sesterheim P • Guma F

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

Correspondência: Priscila M. da Rosa, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Ramiro Barcelos, 2600 –anexo, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre – RS. CEP: 90035-000

e-mail: cilarsbr@gmail.com

RESUMO

Objetivo Com base na capacidade imunomodulatória das células-tronco mesenquimais (MSCs), elas têm sido consideradas importantes ferramentas para o estudo de doenças auto-imunes como o diabetes mellitus tipo 1. Tendo em vista a importância da utilização dos camundongos NOD (nonobese diabetic) como modelos animais para o estudo de diabetes em seres humanos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar o comportamento celular das MSCs derivadas da medula óssea e do pâncreas de camundongos BALB/c, NOD- (normoglicêmico) e NOD+ (hiperglicêmico).

Métodos As MSCs isoladas foram mantidas em meio de cultura e sofreram repiques de acordo com a cinética celular de cada subcultura. Estas células foram caracterizadas através de análise morfológica qualitativa, análise fenotípica e diferenciação adipogênica e osteogênica.

Resultados Somente os camundongos BALB/c apresentaram altas taxas replicativas, alcançando a passagem necessária para a sua carac-

terização. Já as oriundas de NOD+, algumas apresentaram confluência suficiente para efetuação da primeira passagem, que após realizada, pararam de expandir e tornaram-se inviáveis. As MSCs de NOD- apresentaram baixas taxas replicativas tornando-se inviáveis entre segunda e terceira passagem.

Conclusão As MSCs provenientes da medula óssea e do pâncreas de animais NOD encontram-se prejudicadas quanto as suas características básicas de expansão e proliferação *in vitro* quando comparadas às MSCs dos animais normoglicêmicos controles da linhagem BALB/c.

Palavras chaves: Diabetes mellitus tipo 1 • MSC • NOD

Abreviações

DM1	Diabetes mellitus tipo 1
MO	Medula óssea
MSC	Célula-tronco mesenquimal
NOD+	Nonobese diabetic hiperglicêmico
NOD-	Nonobese diabetic normoglicêmico

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune órgão-específica inflamatória, mediada por células T auto-reativas e caracterizadas pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina, resultando num estado de hiperglicemia e suas complicações agudas e crônicas, incluindo microangiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macroangiopatias (doença coronariana, insuficiência arterial periférica entre outras). Se não tratados, os distúrbios metabólicos levam progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. No DM1, o tratamento clássico é a administração de insulina exógena e dentre as estratégias de tratamento definitivo, corrigindo a insulino-dependência, podemos citar o transplante de pâncreas, o transplante de ilhotas pancreáticas e, mais recentemente, o bloqueio da auto-imunidade e a terapia celular baseada na utilização de células-tronco [1, 2].

Dentre todas as células-tronco estudadas até o presente momento, as mesenquimais (MSCs) destacam-se por sua elevada plasticidade, capazes *in vitro* de se diferenciar em células de tecido mesodermal, endodermal e até mesmo células ectodérmicas [3, 4, 5, 6, 7]. Além disso, apresentam características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica. As MSCs secretam uma grande variedade de citocinas pró e antiinflamatórias e fatores de crescimento, proporcionando a modulação da resposta inflamatória, neovascularização ou restabelecimento do suprimento vascular e reparo tecidual, assumindo um papel regulador da

homeostasia tissular e imunológica fisiológica. Tais características do comportamento imunológico das MSC aumentaram as perspectivas de tratamento alógeno e de doenças auto-imunes como o DM1.

A possibilidade de utilizarmos o potencial imunomodulatório ou de diferenciação das MSCs autólogas seria uma fonte alternativa promissora na tentativa de driblarmos problemas como rejeição, protocolos imunossupressores e a fonte escassa de doadores e, conseqüentemente, a insuficiência de células β pancreáticas. Para tanto, surge a necessidade de caracterização das MSCs derivadas de modelos biológicos para DM1. Os camundongos NOD (nonobese diabetic) são o modelo experimental de doença auto-imune órgão-específica mais utilizado em todo o mundo. Apresentam destruição das células beta associada com insulite e produção de auto-anticorpos [8]. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar o comportamento celular das MSCs derivadas de medula óssea e pâncreas de camundongos BALB/c, NOD- (normoglicêmico) e NOD+ (NOD hiperglicêmico).

Metodologia

Animais

Fêmeas de camundongos BALB/c e NOD, com doze semanas de idade, foram criados e mantidos na Coordenação de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Comida e água foram fornecidas à vontade. Este estudo foi realizado, após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob normas de

ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento.

Isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais.

As culturas de células-tronco mesenquimais foram estabelecidas a partir da medula óssea (MO) e do pâncreas dos animais BALB/c, NOD normoglicêmicos e NOD hiperglicêmicos de acordo com a metodologia já descrita na literatura [9]. O meio de cultura era composto de Dulbecco's Modified Eagle Medium/low glucose (DMEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) com 3.7 g/l de bicarbonato de sódio (Sigma, St Louis, MO), 2.5 g/l HEPES (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Culturas primárias foram estabelecidas através do plaqueamento das células em placas de cultura de seis poços (TPP, Trasadin-gen, Suíça), e incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 72 horas. As células não aderentes foram removidas através das trocas de meio e a camada aderente foi realimentada a cada 3 ou 4 dias. Para a subcultura, a camada aderente foi incubada com 0.25% de tripsina e 0.01% de EDTA e replaqueada. A frequência dos repiques foi determinada de acordo com a cinética celular de cada subcultura, sendo que o primeiro repique foi de 1:3 e os demais foram todos de 1:2.

Caracterização das células-tronco mesenquimais

As células foram cultivadas a partir de pâncreas e MO de camun-

dongos BALB/c, NOD- e NOD+, seguindo o protocolo já bem estabelecido de isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais em estado indiferenciado [7]. Para a análise morfológica qualitativa, as culturas de MSC foram frequentemente observadas por microscopia de fase através de um microscópio invertido (Nikon eclipse TE300) e fotografadas usando uma câmera digital (DXM 1200C, Nikon e o programa NIS-Elements F 2.30). Estimou-se a expansão das células com base na área ocupada pelas MSCs (population doubling-PD). À área de crescimento ocupada pela cultura primária foi arbitrariamente dado o valor 1. Ao ocorrer a segunda passagem, a taxa de repique (1:3) foi multiplicada pelo número inicial resultando no valor 3 da área de crescimento acumulada. Este processo foi repetido a cada passagem, fornecendo uma curva de crescimento que é diretamente proporcional ao número de células.

Citometria de fluxo

Para a detecção de antígenos de superfície as células foram tripsinizadas, centrifugadas e incubadas por 30 minutos a 4°C com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugados com os seguintes anticorpos contra murinos: Sca-1, CD11b, CD13, CD29, CD31, CD44, CD45, CD49e, e CD90.2 (Pharmingen BD, San Diego, CA). O excesso de anticorpos foi removido por lavagem. As células foram analisadas usando um citômetro FACScalibur equipado com um laser de argônio de 488nm (Becton Dickinson, San Diego, CA) com o programa CellQuest. No mínimo 10.000 eventos foram coletados.

Diferenciação adipogênica e osteogênica das MSC

As culturas de MSC derivadas da MO e do pâncreas de BALB/c foram submetidas a condições de diferenciação adipogênica e osteogênica a partir da 4ª passagem [9]. Para induzir a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas durante quatro semanas em meio de cultura enriquecido com 10-8M de dexametasona, 2.5 µg/ml de insulina de pâncreas bovino, 100 mM de indometacina e 3.5 µM de rosiglitasona (Sigma). Os adipócitos foram revelados através de coloração com a solução Oil Red O (três volumes de 3.75% de Oil Red O em isopropanol mais dois volumes de água destilada). Diferenciação osteogênica foi induzida mantendo-se a cultura de MSC por quatro semanas em meio de cultura enriquecido com 10-5M de dexametasona, 5µg/ml de ácido ascórbico 2- fosfato e 10 mM de β- glicerofosfato (Sigma). Os osteoblastos foram revelados pela coloração da deposição de cálcio com Alizarin Red S em pH 4.2.

Resultados

Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco mesenquimais murinas.

Todos os animais utilizados foram submetidos a um registro de glicemia capilar através de monitor e glicofitas (tabela 1), com o intuito de se confirmar a normoglicemia nos camundongos BALB/C e NOD- e a hiperglicemia nos NOD+. Foram considerados diabéticos, os animais que apresentavam glicemia superior a 350mg/dL.

Tabela 1 Valores glicêmicos para determinação do DM1 murino.

Camundongo	Glicemia (mg/dL)
BALB/c 1	89
BALB/c 2	101
BALB/c 3	96
NOD ⁻ 1	125
NOD ⁻ 2	114
NOD ⁻ 3	108
NOD ⁺ 1	583
NOD ⁺ 2	598
NOD ⁺ 3	Hi
NOD ⁺ 4	Hi
NOD ⁺ 5	574
NOD ⁺ 6	Hi
NOD ⁺ 7	478

Hi identifica uma glicemia acima de 600mg/dL

Análise morfológica qualitativa das MSCs

As células derivadas de BALB/c, NOD- e NOD+ apresentaram morfologia fusiforme alongada, com núcleo central e alguns prolongamentos e aderiram às garrafas plásticas de cultivo celular (figura 1). Somente os camundongos BALB/c apresentaram altas taxas replicativas. As MSCs de NOD- apresentaram baixas taxas replicativas tornando-se inviáveis entre segunda e terceira passagem. (figura 2). Já as oriundas de NOD+, somente duas medulas ósseas e dois pâncreas apresentaram confluência suficiente para efetuação da primeira passagem, que após realizada, pararam de expandir e tornaram-se inviáveis. As demais MOs e os pâncreas isolados a partir de NOD+ não obtiveram confluência nem para a realização da primeira passagem, permanecendo na placa de cultura até a morte.

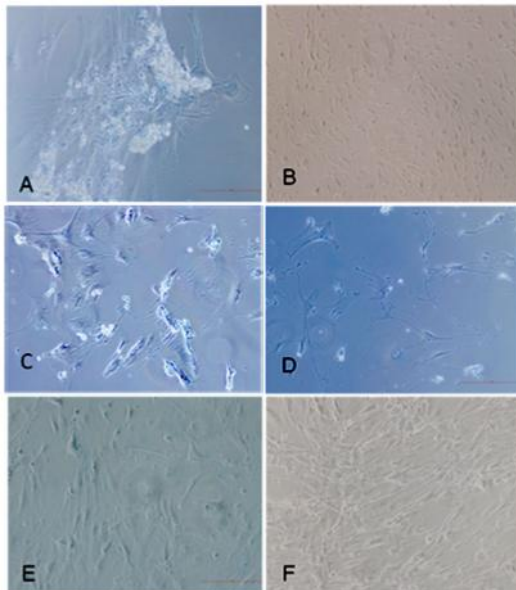


Figura 1 – Microscopia de contraste de fase de MSCs indiferenciadas de NOD- (A-B), NOD+ (C-D) e BALB/c (E-F). MSC oriundas de pâncreas (B, D e F) e MO (A,C e E). Aumento de 100X.

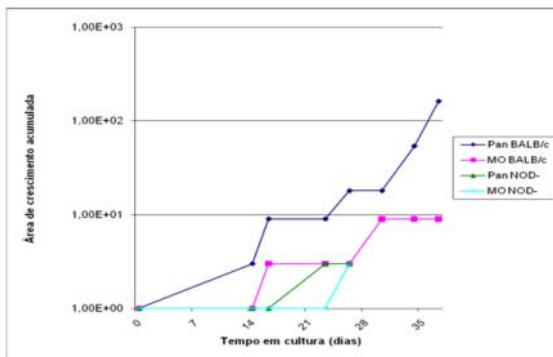


Figura 2 - Gráfico de comparação da cinética de crescimento das mMSCs oriundas de rim, pâncreas e MO.

Análise fenotípica por citometria de fluxo.

Devido à falta de proliferação celular observada nas MSCs oriundas dos camundongos NOD- e NOD+, apenas os camundongos BALB/c atingiram a passagem necessária para serem analisados por esta técnica. A visualização da presença dos marcadores celulares em ensaios de citometria de fluxo objetivou comprovar o fenótipo das células-tronco obtidas do pâncreas e da MO oriundas de BALB/c. As culturas

na 4ª passagem foram submetidas à marcação com anticorpos específicos para Sca-1, CD13, CD11b, CD29, CD44, CD45, CD49e e CD90.2. As figuras 3 e 4 apresentam os resultados observados para as MSCs isoladas do pâncreas e MO de camundongos BALB/c respectivamente, apresentados em forma de histograma.

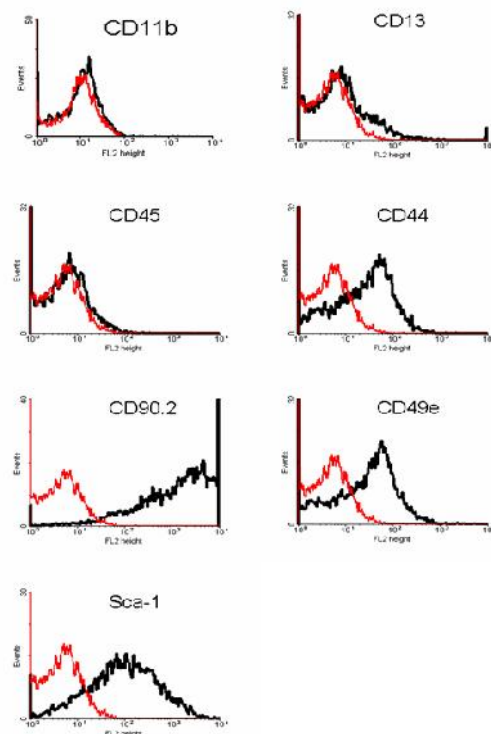


Figura 3 - Perfil imunofenotípico das MSCs derivadas de pâncreas de BALB/c. Os histogramas apresentam a expressão (traço preto) das moléculas selecionadas (Sca-1, CD13, CD11b, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo (traço vermelho).

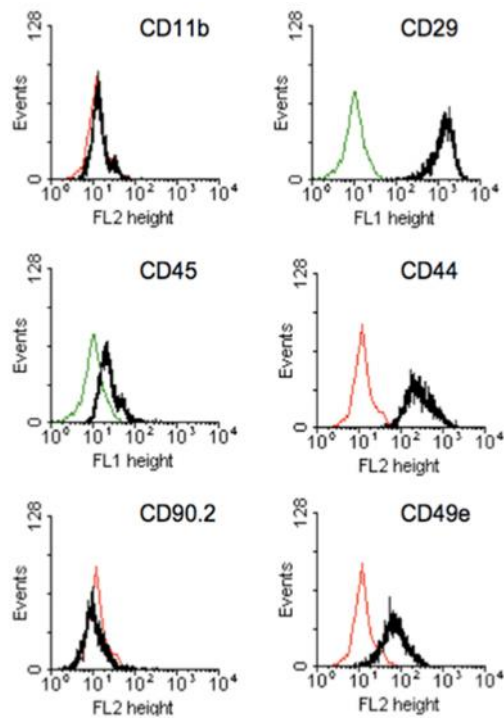


Figura 4 - Perfil imunofenotípico das MSCs derivadas de MO de camundongos BALB/c. Os histogramas apresentam a expressão (traço preto) das moléculas selecionadas (CD11b, CD29, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo (traço colorido).

Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das MSCs in vitro.

Também por não terem uma proliferação celular adequada que atingisse a passagem mínima necessária para a diferenciação, as MSCs provenientes de NOD+ e NOD- não puderam ser analisadas quanto ao seu potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos. As culturas de pâncreas e MO de BALB/c testadas quanto à sua potencialidade para diferenciação em osteoblastos e adipócitos. As células foram submetidas aos protocolos de diferenciação na 4ª passagem. Os resultados mostraram que ambas as culturas foram capazes de originar adipócitos e osteócitos, quando adequadamente induzidas (figura 3). Os vacúolos de gordura

estão evidenciados pelo corante Oil Red O, principalmente nas células isoladas da MO, bem como sua capacidade de diferenciação osteogênica avaliada pelo corante Alizarin Red S que cobre a matriz extracelular rica em cálcio.

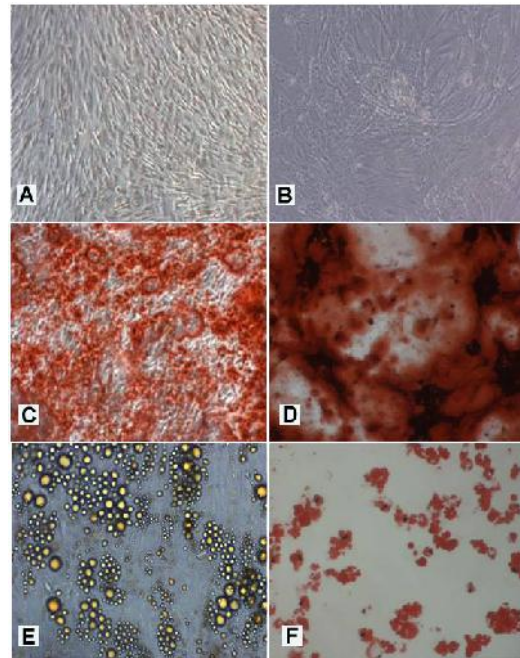


Figura 5 – Diferenciação osteo e adipogênica de mMSCs, após a 4ª passagem, derivadas de MO (A, C, E) e de pâncreas (B, D, F). Depósitos de cálcio na matriz extracelular foram corados com Alizarin Red S (C, D). Vacúolos de gordura corados com Oil Red O (E, F). MSCs cultivadas em meio completo mantêm o aspecto convencional em microscopia de contraste de fase (A e B). Aumento de 100X.

Discussão

O presente estudo evidenciou que características básicas funcionais de células-tronco mesenquimais de medula óssea e pâncreas, incluindo a capacidade de proliferação e de expansão *in vitro* encontram-se prejudicadas no modelo de diabetes mellitus tipo 1 (DM1) espontânea em camundongos NOD, quando comparados aos animais normoglicêmicos controles da linha-

gem BALB/c. Ainda que as razões para tais diferenças em camundongos BALB/c, NOD- e NOD+ não tenham sido investigadas, nossos dados, baseados em cultura *in vitro* em condições idênticas, sugerem que defeitos genéticos sabidamente presentes nos animais NOD poderiam estar contribuindo para a gênese de tais alterações.

Levando-se em consideração as crescentes evidências do potencial angiogênico das MSCs e uma grande similaridade das mesmas com os pericitos, células perivasculares importantes na homeostasia, nossos dados também parecem sugerir que os defeitos observados nas MSCs poderiam de alguma forma estar implicados na patogênese do DM1 espontânea em camundongos.

Sabe-se que a hiperglicemia, considerada o maior fator de risco para complicações microvasculares em pacientes diabéticos, é responsável por induzir apoptose nestes tecidos vasculares de forma direta ou indireta através da alteração da expressão de citocinas, gerando um acúmulo de produtos tóxicos em órgãos afetados pelo diabetes. Além disso, embora o uso de insulina exógena em pacientes diabéticos possa retardar suas complicações, tal tratamento não diminui de forma significativa a progressão de doenças microvasculares, sugerindo que a hiperglicemia induz alterações crônicas nestas células que são difíceis de reverter [10].

A hiperglicemia induz um aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias o que aumenta o estresse oxidativo e termina por ativar diversos mecanismos que levam a complicações vasculares em pacientes diabéticos [11]. Além do aumento de estresse oxidativo, a hiperglicemia pode cau-

sar apoptose das células vasculares através da ativação de PKC- δ (proteína pertencente à família multigênica da Proteína Quinase C – PKC, presente nas ilhotas pancreáticas, monócitos, cérebro e tecidos vasculares - retina, rins e coração). Resultados demonstram que a hiperglicemia ativa PKC- δ provavelmente aumentando a transcrição do gene que codifica esta proteína. Esta ativação da PKC- δ induz a desativação do PDGF-B (um fator de crescimento derivado de plaquetas que faz parte de uma família de fatores mitogênicos para células de origem mesenquimal), resultando em perda tanto de células do pericito quanto de células endoteliais [10].

Sendo assim, analisamos os resultados obtidos do isolamento e expansão das MSCs oriundas de NOD+ e nos questionamos se estes mecanismos provenientes da hiperglicemia destes animais diabéticos não estariam atuando no comprometimento dos pericitos. Se extrapolarmos estes efeitos causados pela hiperglicemia para os camundongos NOD diabéticos, poderíamos explicar a dificuldade de isolar e expandir MSCs oriundas de MO e pâncreas de NOD+.

Por outro lado, os NOD-, apesar de serem normoglicêmicos, apresentaram resultados mais similares com os NOD+ do que com os animais BALB/c normoglicêmicos controles. Estes resultados poderiam ser explicados devido à ativação sistêmica de células T e de macrófagos em modelos auto-imunes onde alterações vasculares já estão presentes em indivíduos normoglicêmicos suscetíveis ao diabetes antes mesmo do aparecimento da hiperglicemia. Sendo assim, processos inflamatórios por si só poderiam contribuir para alterações vasculares em camundongos NOD [12].

Além disso, todos os camundongos NOD, tanto machos quanto fêmeas a partir de três ou quatro semanas de idade, apresentam insulite, independentemente do desenvolvimento do diabetes. Isto demonstra que o processo inflamatório está presente nestes animais mesmo antes da progressão da doença [13].

Diferentes estudos encontrados na literatura tentam explicar a relação entre o processo inflamatório e a disfunção endotelial [14, 15, 16]. Sabe-se que o processo inflamatório pode afetar o endotélio vascular através da “ativação” de células endoteliais por fatores pró-inflamatórios incluindo TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e proteína C reativa (um indicador extremamente sensível de inflamação produzido pelo fígado). O TNF- α , por exemplo, diminui a expressão de eNOS (Óxido Nítrico Sintetase Endotelial) em culturas de células endoteliais, levando a uma diminuição de NO (Óxido Nítrico), um importante vasodilatador. Além disso, a ativação do endotélio estimula a adesão de linfócitos e outros fatores que aceleram o processo inflamatório [15].

Um estudo recentemente descrito na literatura apresentou resultados diferentes dos que obtivemos com MSC provenientes de MO de NOD-. De acordo com este estudo, foi possível isolar e caracterizar MSCs oriundas de MO de camundongos NOD normoglicêmicos demonstrando que estas células tiveram uma proliferação satisfatória [17]. Por outro lado, a escassa informação na literatura sobre a caracterização das MSCs oriundas de camundongos NOD reforça o fato destes dados ainda serem bastante preliminares e sugere que mais estudos devem ser realizados na busca de uma melhor compreensão do

papel das MSCs e seu comportamento na patogênese do DM1.

Agradecimentos Agradecemos à Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (RS, Brasil) pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho, ao Dr. Carlos A. S. Gonçalves (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pela disponibilização de materiais e equipamentos e à Silvia Terra e Maria Cristina Guerra (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pelo apoio incansável.

Referências

1. Efrat S. Generation of insulin-producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes (2004) *Isr Med Assoc J* 6:1-3.
2. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus (2007) *JAMA* 297:1568-76.
3. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL e Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo (2000) *Nature Med* 6(11):1229-1234.
4. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors (1998) *Science* 279:528-530.
5. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells

- (2001) *J Clin Invest* 107:1395-1402.
6. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716.
 7. da Silva Meirelles L, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization (2003) *Br J Haematol* 123:702-711.
 8. Thayer TC, Wilson SB, Mathews CE. Use of Nonobese Diabetic Mice to Understand Human Type 1 Diabetes (2010) *Endocrinol Metab Clin N Am* 39:541-561.
 9. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues (2006) *J Cell Sci.* 119:2204-13.
 10. Geraldès P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Cleromnt A, et al. Activation of PCK- δ and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy (2009) *Nature* 15(11):1298-1307.
 11. Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction (2005) *Clin Sci* 109:143-159.
 12. Traupe T, Nett PC, Frank B, Tornillo L, et al. Impaired vascular function in normoglycemic mice prone to autoimmune diabetes: Role of nitric oxide (2007) *European J of Pharma* 557:161-167.
 13. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: A Model of Immune Dysregulation (2005) *Annu Rev Immunol*, 23:447-485.
 14. Bakker W, Eringa EC, Spikema P, van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity (2009) *Cell Tissue Res* 335:165-189.
 15. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, VITA JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications (2010) *Rev Endocr Metab Disord* 11(1):61-74.
 16. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis (2004) *Rheum Dis Clin N Am* 30:97-114.
 17. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, et al. Immunomodulatory Function of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Autoimmune Type 1 Diabetes (2009) *The J Immunol* 183:993-1004.