

Células Estromais Mesenquimais (CEM) Derivadas de Medula Óssea de Ratos com e sem Diabetes têm Potencial Terapêutico Similar

Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSC) from Diabetic and Nondiabetic Rats Have Similar Therapeutic Potentials

Vitória Santório de São José,* Gustavo Monnerat,* Barbara Guerra, Bruno Dias Paredes, Tais Hanae Kasai-Brunswick, Antonio Carlos Campos de Carvalho, Emiliano Medei

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ – Brasil

* Contribuição equivalente

Resumo

Fundamentos: O diabetes mellitus é uma doença crônica grave que leva a complicações sistêmicas, como a disfunção cardiovascular. Estudos anteriores de terapia celular obtiveram resultados promissores com utilização de células estromais mesenquimais (CEM) derivadas de medula óssea de animais saudáveis (CEMc) em modelos de animais diabéticos. No entanto, a capacidade das CEM derivadas de ratos diabéticos em melhorar parâmetros cardíacos funcionais é ainda desconhecida.

Objetivos: Investigar se CEM derivadas de medula óssea de ratos diabéticos (CEMd) poderiam contribuir para a recuperação metabólica e de propriedades elétricas cardíacas em outros ratos também com diabetes.

Métodos: O diabetes foi induzido em ratos Wistar com estreptozotocina. As CEM foram caracterizadas por citometria de fluxo, análise morfológica e imunohistoquímica. A função elétrica cardíaca foi analisada através de registro do potencial de ação ventricular. As diferenças entre as variáveis foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados: As propriedades *in vitro* das CEMc e CEMd foram avaliadas. Ambos os tipos celulares apresentaram morfologia, cinética de crescimento e perfil mesenquimal semelhante, e puderam ser diferenciadas em linhagens adipogênica e osteogênica. No entanto, em ensaios para unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F), as CEMd formaram mais colônias em comparação às CEMc quando cultivadas em meio com ou sem hidrocortisona ($1 \mu\text{M}$). Para comparar o potencial terapêutico das células, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: não diabéticos (CTRL), diabéticos (DM), diabéticos tratados com CEMc (DM + CEMc) e diabéticos tratados com CEMd (DM + CEMd). Os grupos tratados receberam uma única injeção de CEM 4 semanas após o estabelecimento do diabetes. Ambas CEMc e CEMd controlaram a hiperglicemia e a perda de peso corporal e melhoraram o remodelamento elétrico cardíaco em ratos com diabetes.

Conclusão: As CEMd e CEMc possuem propriedades *in vitro* e potencial terapêutico semelhante em um modelo de rato com diabetes induzido por estreptozotocina. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(6):579-589)

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Células Mesenquimais Estromais; Eletrofisiologia Cardíaca; Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos; Ratos.

Abstract

Background: Diabetes mellitus is a severe chronic disease leading to systemic complications, including cardiovascular dysfunction. Previous cell therapy studies have obtained promising results with the use bone marrow mesenchymal stromal cells derived from healthy animals (MSCc) in diabetes animal models. However, the ability of MSC derived from diabetic rats to improve functional cardiac parameters is still unknown.

Objectives: To investigate whether bone-marrow-derived MSC from diabetic rats (MSCd) would contribute to recover metabolic and cardiac electrical properties in other diabetic rats.

Methods: Diabetes was induced in Wistar rats with streptozotocin. MSCs were characterized by flow cytometry, morphological analysis, and immunohistochemistry. Cardiac electrical function was analyzed using recordings of ventricular action potential. Differences between variables were considered significant when $p < 0.05$.

Results: *In vitro* properties of MSCc and MSCd were evaluated. Both cell types presented similar morphology, growth kinetics, and mesenchymal profile, and could differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. However, in an assay for fibroblast colony-forming units (CFU-F), MSCd formed more colonies than MSCc when cultured in expansion medium with or without hydrocortisone ($1 \mu\text{M}$). In order to compare the therapeutic potential of the cells, the animals were divided into four experimental groups: nondiabetic (CTRL), diabetic (DM), diabetic treated with MSCc (DM + MSCc), and diabetic treated with MSCd (DM + MSCd). The treated groups received a single injection of MSC 4 weeks after the development of diabetes. MSCc and MSCd controlled hyperglycemia and body weight loss and improved cardiac electrical remodeling in diabetic rats.

Conclusions: MSCd and MSCc have similar *in vitro* properties and therapeutic potential in a rat model of diabetes induced with streptozotocin. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(6):579-589)

Keywords: Diabetes Mellitus; Mesenchymal Stromal Cells; Cardiac Electrophysiology; Cell and Tissue-Based Therapy; Rats.

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

Correspondência: Gustavo Monnerat •

Av. Carlos Chagas Filho, CCS, Bloco G sala G2-45. CEP 21941-590, 21941-590, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Email: gmc@biof.ufrj.br, monnerat1988@gmail.com

Artigo recebido em 23/01/2017, revisado em 19/04/2017, aceito em 28/04/2017

DOI: 10.5935/abc.20170176

Introdução

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada principalmente por hiperglicemia crônica, que ocasiona diversas complicações em diferentes órgãos e sistemas.¹ Apesar de terapia com insulina, programas de exercício e intervenções nutricionais, a maioria dos pacientes com diabetes é incapaz de manter os níveis glicêmicos dentro da faixa normal, levando a complicações patológicas. Embora o diabetes seja uma doença sistêmica, as principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas a esta condição são as complicações cardíacas. Mais de 75% de todas as mortes em pacientes com diabetes são causadas por complicações cardiovasculares.²⁻⁴ Neste contexto, a cardiomiopatia diabética ocasiona alterações elétricas cardíacas, incluindo aumento dos intervalos QT e QTc e dispersão do QT. De fato, estas anormalidades eletrocardiográficas pró-arrítmicas são desencadeadas por um prolongamento da duração do potencial de ação (AP) como consequência do remodelamento elétrico cardíaco que ocorre na doença.⁵⁻⁹

Uma pequena população de células mononucleares da medula óssea denominada células estromais mesenquimais (CEM) é uma fonte atraente de células para tratar o diabetes e suas complicações cardiovasculares.^{7,10,11} As CEM têm potencial clonogênico¹² e sob condições específicas de cultura, são capazes de se diferenciar em células de diferentes linhagens mesenquimais como osteoblastos, condrócitos e adipócitos.^{13,14} Além disso, as CEM são células-tronco multipotentes com propriedades imunomoduladoras capazes de regular diversas respostas fisiológicas.¹⁵ O controle da inflamação é uma potente intervenção terapêutica para várias doenças autoimunes, bem como processos inflamatórios estéreis como o diabetes.¹⁵⁻²⁰

Os mecanismos subjacentes aos efeitos terapêuticos das CEM são principalmente devidos à sua secreção de fatores parácrinos, estimulada por microambientes hiperglicêmicos e inflamatórios. Com efeito, as CEM têm sido descritas como secretoras de fatores cardioprotetores que podem melhorar a função cardíaca.^{15,16,21-24} Além disso, o potencial terapêutico das CEM na restauração do controle metabólico em ratos com diabetes já foi demonstrado.^{25,26} Um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que ratos diabéticos transplantados com CEM de medula óssea de ratos saudáveis (CEMc) apresentou melhora da regulação metabólica e reversão de anormalidades elétricas e mecânicas cardíacas induzidas pelo diabetes através de imunomodulação sistêmica.⁷

Vários estudos têm relatado que as CEM de medula óssea derivadas de doadores saudáveis são benéficas no tratamento do diabetes, com base nas propriedades imunomoduladoras e regenerativas dessas células. No entanto, a possibilidade do autotransplante de CEM simplificaria a aplicação clínica desta terapia celular em pacientes com diabetes, considerando que o transplante de células autólogas minimiza complicações para o recipiente como a rejeição, tratamento imunossupressor e transmissão de agentes infecciosos.

Com base nesta perspectiva clínica, o objetivo do presente estudo foi verificar se o transplante de CEM de medula óssea de ratos doadores diabéticos (CEMd) poderia contribuir para a recuperação das funções metabólicas e cardíacas de outros ratos igualmente diabéticos. A fim de conseguir isso, um estudo comparativo entre CEMc e CEMd foi realizado em ratos.

Métodos

Animais e protocolos

Todos os procedimentos em animais foram realizados de acordo com o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*National Institutes of Health* [NIH], EUA) e aprovado pelo nosso comitê institucional local sob o número de protocolo IBCCF 217-09/16. Neste estudo, ratos Wistar machos (100 ± 20 g) com 1 mês de idade foram alojados sob temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclos luminosos de 12 horas e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. O diabetes foi induzido como descrito abaixo. Quatro semanas após o estabelecimento do diabetes, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: (A) ratos não diabéticos que receberam apenas o veículo (CTRL; $n = 7$), (b) ratos diabéticos que receberam apenas o veículo (DM; $n = 7$), (c) ratos diabéticos transplantados com CEM de medula óssea de animal saudável (DM + CEMc; $n = 7$) e (4) ratos diabéticos transplantados com CEM de medula óssea de outros ratos diabéticos (DM + CEMd; $n = 8$). O veículo e as células foram injetados no plexo retro-ocular dos animais. O peso corporal e os níveis glicêmicos foram medidos semanalmente durante 4 semanas após a terapia com as células em todos os quatro grupos experimentais. A Figura 1 ilustra o delineamento do estudo.

Indução do diabetes e medidas de glicose

O diabetes foi induzido com uma dose intravenosa única de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, EUA) 80 mg/kg diluída em tampão citrato (0,05 M) administrada a animais anestesiados (isoflurano, Baker Norton, Reino Unido).⁷ Animais não diabéticos (grupo CTRL) receberam apenas o veículo. Após 72 horas da indução anestésica, os animais foram mantidos em jejum por 5 horas durante o início da manhã e tiveram seus níveis glicêmicos medidos. Apenas animais com glicemia acima de 250 mg/dL foram considerados diabéticos. Os níveis glicêmicos foram analisados com um glicosímetro padrão (Contour TS, Bayer Healthcare LLC, EUA). As amostras de sangue foram obtidas a partir da veia da cauda de animais não anestesiados.

Células estromais mesenquimais: isolamento e cultura

Os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical. As pernas dos animais foram limpas com álcool a 70% e as tíbias e fêmures foram isolados e centrifugados a 1.000 xg por 3 min a 4°C para coleta de células da medula óssea. A suspensão de células foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugada a 300 xg por 5 min a 4°C . Os grupamentos celulares foram diluídos em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco-Invitrogen, EUA) e centrifugados em gradiente Histopaque (1,083 g/mL, Sigma-Aldrich, EUA) a 400 xg por 30 minutos. As células mononucleares foram coletadas da interface e lavadas três vezes em PBS e suas viabilidades foram verificadas com utilização de solução de azul de tripano a 0,4% (Sigma-Aldrich). Por fim, as células foram plaqueadas a uma densidade de $1,2 \times 10^6$ células/cm² e mantidas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ de 5%. O meio (DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino [Gibco-Invitrogen, EUA] e penicilina G/estreptomicina 1% [Gibco-Invitrogen]) foi

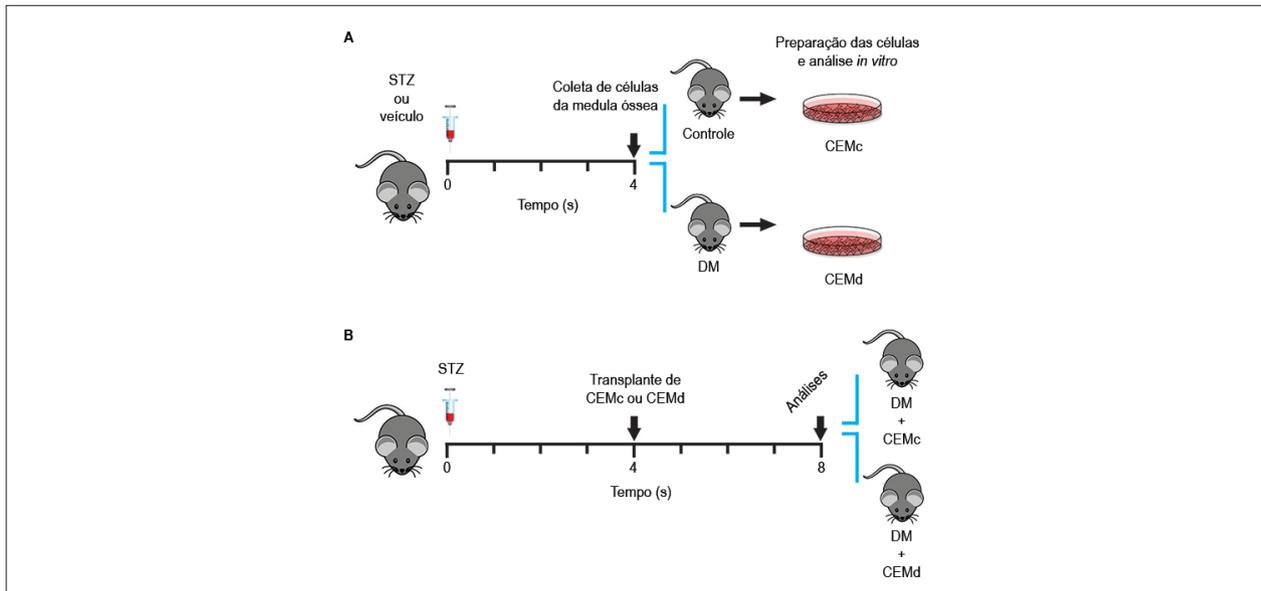


Figura 1 – Delineamento do estudo experimental. (A) Os animais foram tratados com o veículo e estreptozotocina (STZ) na semana 0. Células da medula óssea foram coletadas na semana 4 para cultura e análises in vitro. (B) Esquema de terapia com CEM. Animais diabéticos (STZ) foram divididos em dois grupos: o primeiro recebeu 5 x 10⁶ células de ratos saudáveis (DM + CEMc) e o segundo recebeu a mesma quantidade de células obtidas de ratos diabéticos (DM + CEMd) com 4 semanas de doença. As células foram injetadas no plexo retro-ocular dos animais. Os níveis de glicemia e o peso corporal foram avaliados durante 4 semanas após o transplante. Ao final do protocolo, os animais foram sacrificados e os corações foram isolados para gravação de potencial.

mudado duas vezes por semana, preservando apenas as células aderentes. Quando 80-90% de confluência foi alcançada, as células aderentes foram destacadas das placas de cultura com tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) e expandidas a uma densidade de 1,2 x 10⁴ células/cm² até a terceira passagem, como descrito anteriormente.⁷

Caracterização imunofenotípica

Para a análise imunofenotípica, CEMc e CEMd em terceira passagem foram dissociadas e suspensas em solução bloqueadora contendo PBS gelado suplementado com albumina de soro bovino (BSA) a 0,5%. As células foram tratadas com Fc Block (Cat#550271; BD Biosciences, EUA) durante 20 minutos antes da incubação com anticorpos. Os seguintes anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ou biotina foram utilizados: CD29 (clone Ha2/5, Cat#555005, diluição 1:50; BD Biosciences), CD90-1 (clone OX-7, Cat#551401, diluição 1:25; BD Biosciences), CD45 (clone 30-F11, Cat#553077, diluição 1:50; BD Biosciences) e CD34 (clone RAM34, Cat#551387, diluição 1:50; BD Biosciences). Os isotipos correspondentes (BD Biosciences) foram utilizados como controles de ligação não específica. Após incubação a 4°C durante 20 minutos, as células foram lavadas com PBS / 0,5% BSA, centrifugadas a 300 xg por 5 minutos e suspensas em PBS para aquisição de dados. DAPI 0,1 µg/mL (Cat# D9452, Sigma-Aldrich) foi adicionado para excluir células mortas. As amostras foram obtidas com citometria de fluxo BD FACSAria II (BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo, versão 10.1.

Diferenciação adipogênica e osteogênica

CEMc (n = 3) e CEMd (n = 3) em terceira passagem foram plaqueadas em uma placa de seis poços a 3 x 10⁴ células por poço. O meio foi alterado duas vezes por semana e nenhuma passagem foi realizada durante os protocolos de diferenciação. Para a diferenciação adipogênica, o meio de cultivo foi suplementado com dexametasona 1 µM (Sigma-Aldrich), IBMX 0,5 mM (Sigma-Aldrich), insulina 10 µg/mL (Sigma-Aldrich) e indometacina 200 µM (Vetec Química Fina, Brasil). As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ a 5% por 21 dias e em seguida fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, enquanto as gotículas de lipídeos citoplasmáticos foram coradas com óleo vermelho O a 0,5%. A diferenciação osteogênica foi realizada com cultura de CEMc e CEMd em meio de cultivo suplementado com dexametasona 1 µM (Sigma-Aldrich), β-glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) e ácido ascórbico 0,5 µM (Sigma-Aldrich) por 21 dias. As células foram então fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos e depósitos de cálcio extracelular foram corados após incubação com vermelho de alizarina a 1% em água.

Tempo de duplicação da população (TDP)

Para avaliação da cinética de crescimento, CEMc e CEMd (passagem 3) foram cultivadas em pratos para cultura celular de 35 mm com uma grade de 2 mm (Sarstedt, EUA) a uma densidade de 1,2 x 10³ células/cm². As células foram mantidas em meio de cultivo e incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ a 5% por 7 dias. Quatro grades aleatórias foram contadas diariamente e o número médio de células por mm² foi calculado. Os valores obtidos foram utilizados para

construir uma curva de célula/mm² versus tempo. Foi realizada regressão linear com transformação logarítmica na base 2 do eixo célula/mm², no qual o inverso do coeficiente angular α foi utilizado para calcular a TDP.

Unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F)

A fim de realizar este experimento, células mononucleares recentemente isoladas derivadas de ratos diabéticos (CEMd; n = 3) e não diabéticos (CEMc; n = 3) foram isoladas e plaqueadas em placas de seis poços a uma densidade de 2,08 x 10⁵ células/cm² em cada poço. As células foram cultivadas em meio de cultivo suplementado ou não com hidrocortisona 1 μ M. Após 16 dias, as células foram fixadas com metanol PA (Vetec Química Fina) por 5 minutos e as colônias foram contadas manualmente após coloração com Giemsa (Merck, Alemanha).

Protocolo de terapia celular

Ratos diabéticos foram transplantados com 5 x 10⁶ CEMc de ratos saudáveis (DM + CEMc; n = 7) ou 5 x 10⁶ CEMd de ratos diabéticos (DM + CEMd; n = 8). As células foram transplantadas através do plexo retro-ocular (200 μ L). Os níveis glicêmicos e o peso corporal foram avaliados por 4 semanas após o transplante. Ao final do protocolo, os animais foram sacrificados e os corações foram isolados para gravação do AP. Ratos controles e diabéticos receberam injeções retro-oculares com o mesmo volume de solução salina.

Gravação do potencial de ação

Para a gravação do AP, tiras de músculo cardíaco do ventrículo esquerdo foram obtidas e presas à parte inferior do banho do tecido, revestido com Sylgard para exposição do lado endocárdico. As tiras foram continuamente perfundidas com solução de Tyrode oxigenada a 37°C. A composição da solução de Tyrode (mM) era: NaCl 150,8, KCl 5,4, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 1,0, D-glucose 11,0 e HEPES 10,0 (pH 7,4 ajustado com NaOH a 37,0 \pm 0,5°C). O tecido foi estimulado a um ciclo básico com duração de 1.000 ms. O potencial transmembrana foi gravado com microeletrodos de vidro (10-40 M Ω resistência DC) preenchidos com 2,7 M KCl, conectados a um amplificador de microeletrodo com entrada de alta impedância (MEZ7200, Nihon Kohden, Japão). Sinais amplificados foram digitalizados (1440 Digidata A/D interface, Axon Instrument, Inc., Sunnyvale, EUA) e armazenados em um computador para posterior análise com o programa LabChart, 7.3 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os seguintes parâmetros de AP foram analisados: potencial de repouso de membrana, amplitude (APA) e duração do AP a 90% de repolarização (APD₉₀), conforme descrito previamente.²⁷

Análise estatística

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão (DP). Para os ensaios *in vitro*, comparações entre CEMc e CEMd foram realizadas com o teste *t* de Student não pareado e para análises *in vivo*, foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados com distribuição não Gaussiana (teste de Kolmogorov-Smirnov) foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças entre

as variáveis foram consideradas significativas quando p < 0,05. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra não foi predeterminado com métodos estatísticos e foi estimado com base na disponibilidade de amostras e estudos cardiovasculares experimentais prévios utilizando tratamento com células-tronco.⁷

Resultados

Morfologia e fenótipo de superfície das CEMc e CEMd

As CEMc e CEMd aderiram a plástico e apresentaram uma morfologia semelhante à do fibroblasto 3 a 4 dias após serem semeadas em frascos de cultura. Células não aderentes observadas nas culturas primárias foram descartadas com as trocas de meio. A Figura 2A mostra CEMc e CEMd em terceira passagem. O perfil mesenquimal das CEMc e CEMd foi avaliado pela expressão de marcadores-chave na superfície de células de terceira passagem por citometria de fluxo. Ambos os tipos celulares foram positivos para os marcadores associados às CEM (CD29 e CD90, > 90%) e negativos para os marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34, \leq 2,5%) (Figuras 2B e 2C). Os fenótipos das células CEMc e CEMd foram semelhantes.

Diferenciação adipogênica e osteogênica

Durante o processo de diferenciação adipogênica, a formação de gotículas lipídicas foi observada já na primeira semana (Figura 3A). A diferenciação adipogênica permaneceu por 21 dias. Durante este período, as gotículas aumentaram de volume e em número. Ao final do protocolo, vacúolos ricos em lipídeos foram corados com óleo vermelho O.

A diferenciação osteogênica das CEMc e CEMd também iniciou durante a primeira semana (Figura 3B). Ambos os grupos experimentais mostraram mudanças morfológicas rápidas que permaneceram por 21 dias, até o final do experimento. Aos 21 dias, depósitos de cálcio foram observados após coloração com vermelho de alizarina, caracterizando mineralização da matriz.

Como controles para ambos os protocolos de diferenciação, culturas de células obtidas a partir de animais diabéticos e saudáveis foram cultivadas durante todo o protocolo com meio de cultivo e, como esperado, não mostraram formação de vacúolos lipídicos ou depósitos de cálcio.

Cinética de crescimento

A fim de avaliar a cinética de crescimento das CEMc e CEMd, as células foram plaqueadas em pratos e observadas até chegarem a 100% de confluência no dia 7. A taxa de proliferação foi determinada por monitorização diária dos pratos de cultura (Figura 4A). Como mostra a Figura 4B, CEMc de ratos diabéticos e saudáveis apresentaram características cinéticas de crescimento semelhantes.

Propriedades clonogênicas

A fim de avaliar a capacidade das CEMc e CEMd em formar colônias, foram realizados ensaios para UFC-F em DMEM/alta glicose na presença e ausência de hidrocortisona

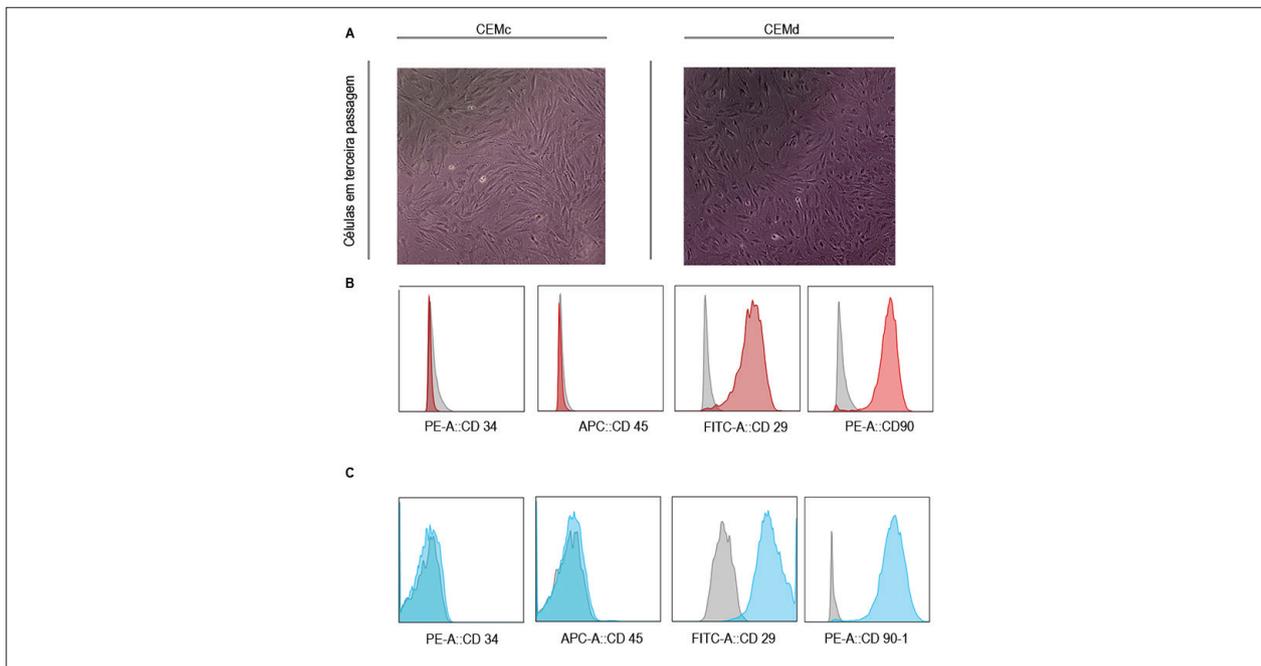


Figura 2 – Caracterização do perfil de CEM na terceira passagem. (A) CEMc e CEMd com morfologia semelhante à de fibroblastos 4 dias após as células serem semeadas em pratos de cultura. (B) Análise de citometria de fluxo de CEM derivadas de animais saudáveis (CEMc) e (C) CEM derivadas de animais diabéticos (CEMd). Histogramas coloridos mostrando a alta expressão de proteínas de superfície mesenquimais (CD29 e CD90) e baixa expressão de marcadores hematopoiéticos (CD34 e CD45). Os histogramas cinzas representam os isotipos controles.

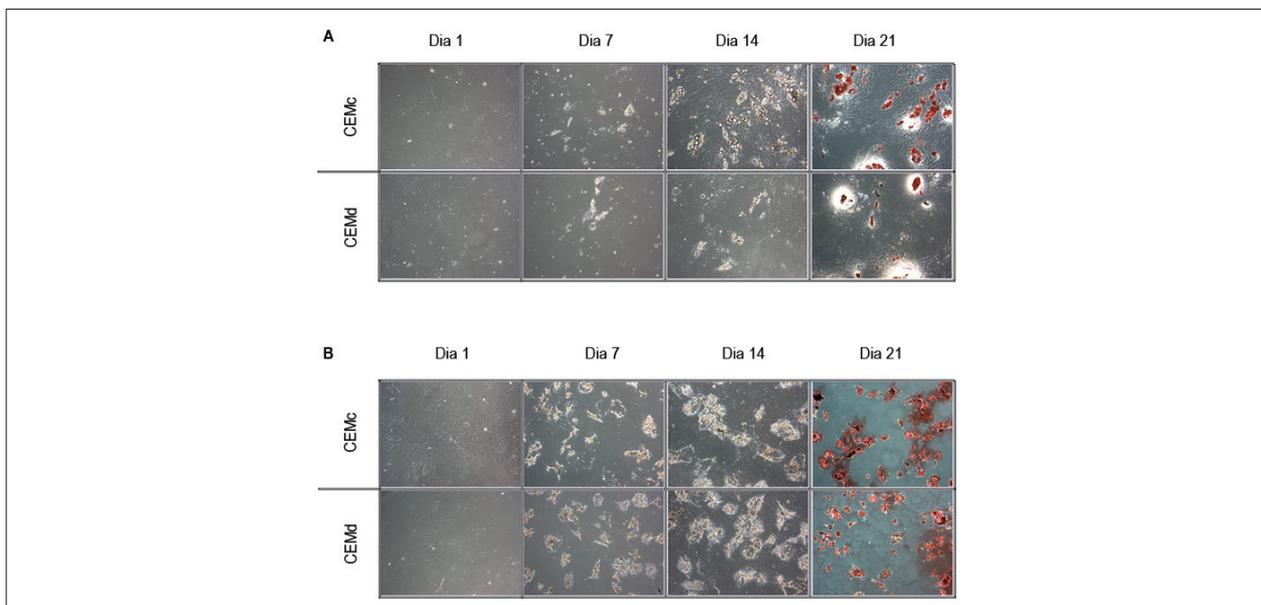


Figura 3 – Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica. Os ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica foram realizados durante 21 dias com utilização de CEMc e CEMd. O protocolo foi iniciado com 60% de confluência da cultura. (A) No ensaio adipogênico, pequenas gotículas de lipídeos estavam presentes tanto nas CEMc quanto nas CEMd no dia 7 e aumentaram de volume e em número no dia 14. No dia 21, as culturas foram coradas com óleo vermelho O e as gotículas de lipídeos foram coradas em vermelho. Tanto as CEMc quanto as CEMd se diferenciaram em adipócitos ao final do protocolo. (B) No ensaio osteogênico, observamos dramáticas mudanças morfológicas começando no dia 7 em ambas as CEMc e CEMd, com acentuação no dia 14. No dia 21, as culturas foram coradas com vermelho de alizarina e os depósitos de cálcio coraram em vermelho. Tanto as CEMc quanto as CEMd geraram uma matriz mineralizada ao final do protocolo.

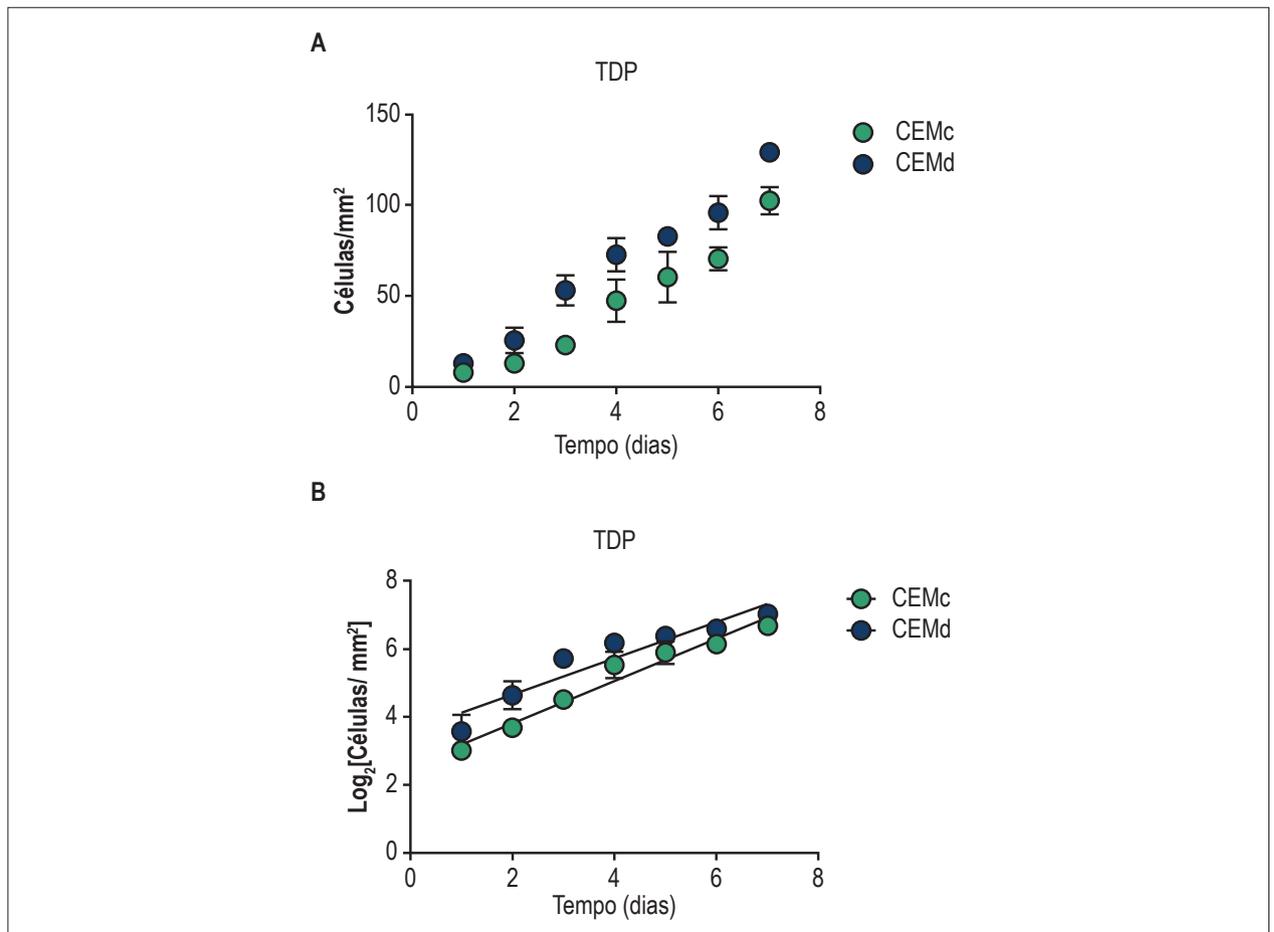


Figura 4 – Avaliação da cinética de crescimento por ensaio de tempo de duplicação da população (TDP). (A) O número de CEM foi calculado diariamente (células/mm²) após plaqueamento de 104 células no dia zero por 7 dias. (B) Regressão linear do logaritmo do crescimento celular (células/mm²). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (DP). Abreviações: CEMc - CEM derivadas de animais saudáveis; CEMd - CEM derivadas de animais diabéticos.

(1 μ M). Ambos os tipos celulares foram capazes de gerar UFC-F sob ambas as condições (Figuras 5A e 5B). No entanto, o número de colônias foi maior nas culturas com meios suplementados com hidrocortisona em ambos os grupos experimentais (Figura 5B). Além disso, as CEMd formaram mais UFC-F do que as CEMc, independente do protocolo aplicado (Figuras 5D e 5E).

Melhora metabólica após transplante de CEM

A fim de avaliar o potencial terapêutico de ambos os tipos celulares, 4 semanas após o estabelecimento do modelo de ratos diabéticos, CEMc ou CEMd (5×10^6 células) foram transplantadas com uma única injeção em ratos diabéticos. As CEMd apresentaram potencial terapêutico semelhante às CEMc, com melhora dos níveis de glicose (Figura 6A). Em ambos os grupos tratados com células, os níveis de glicemia foram mais baixos do que os observados no grupo placebo, porém mais altos do que nos ratos sem diabetes. A perda de peso corporal nos grupos de diabéticos foi também parcialmente resgatada pelo transplante de CEMc e CEMd (Figura 6B).

CEMd melhoram o perfil do potencial de ação cardíaco

Resultados prévios obtidos pelo nosso grupo mostraram que o transplante de CEMc foi capaz de reverter o prolongamento do AP cardíaco a 90% de repolarização induzido pelo diabetes.⁷ No presente estudo, observamos que o transplante com CEMd foi também capaz de reverter o prolongamento do AP a 90% de repolarização (Figuras 7A e 7B).

Discussão

O potencial da terapia com CEMc no diabetes tem sido demonstrado por vários grupos, indicando benefícios metabólicos tais como melhora nos níveis de glicemia,^{21,25} função renal,²⁸ neuropatia,²⁹ complicações microvasculares³⁰ e função cardíaca.⁷ No entanto, a maioria destes estudos utilizou CEM alogênico. Conseqüentemente, a utilização de CEM autólogas obtidas de doadores com diabetes deve ser realizada para a avaliação do efeito em um modelo diabético animal.

O nosso primeiro objetivo foi determinar o grau de semelhança fenotípica e funcional entre as CEMc e CEMd

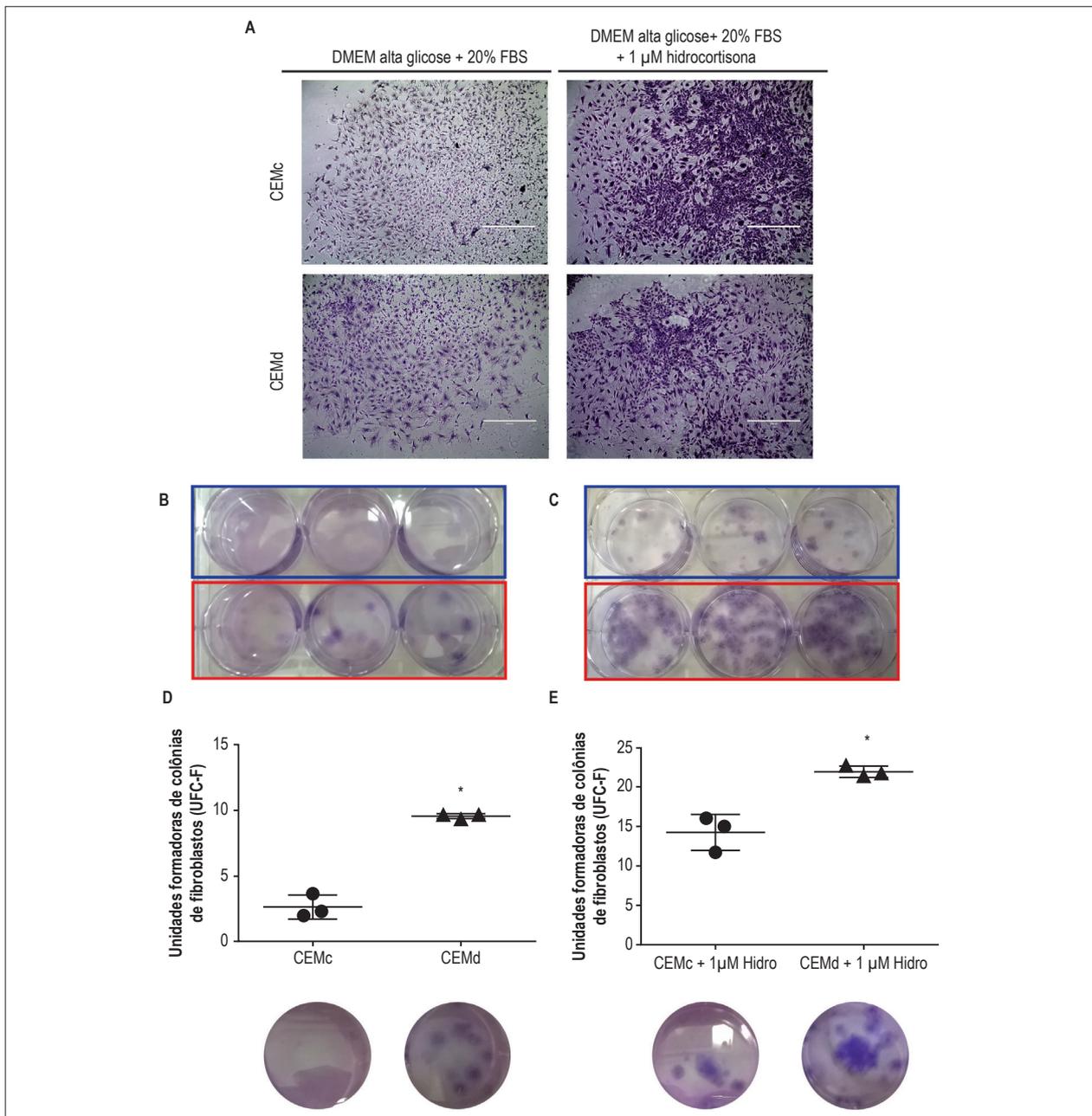


Figura 5 – Ensaio de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F). (A) Fotomicrografias representativas das colônias de CEMc e CEMd obtidas após ensaio de UFC-F com utilização de duas condições diferentes, com e sem hidrocortisona. (B) Vista macroscópica da formação de UFC-F após as células serem cultivadas na ausência da condição com hidrocortisona. As CEMc formaram menos colônias UFC-F do que as CEMd. (C) Vista macroscópica da formação de UFC-F após as células serem cultivadas na presença da condição com hidrocortisona 1 μM. As CEMc novamente formaram menos colônias UFC-F do que as CEMd. (D-E) Comparações quantitativas entre os números de colônias UFC-F com formação de maior número nas CEMd do que nas CEMc em ambas as condições. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (DP) e * representa $p < 0,05$.

através de análises *in vitro*. Uma vez que ambos os tipos celulares puderam ser isolados e cultivados, uma caracterização completa foi realizada. Estas células mostraram ser muito semelhantes em vários aspectos, mantendo uma forma morfológica semelhante à do fibroblasto, perfis mesenquimais, cinética de crescimento e capacidade de diferenciação mesmo após 4 semanas da indução do diabetes. Alinhados com os nossos achados, estudos

anteriores demonstraram que CEM derivadas de medula óssea humana de pacientes saudáveis têm propriedades semelhantes às derivadas de pacientes com diabetes.^{31,32}

Uma vez que as alterações dos níveis de glicose podem interferir com o potencial clonogênico³³ das células, foram realizados ensaios para UFC-F. Os resultados mostraram que as células derivadas de animais com diabetes apresentaram

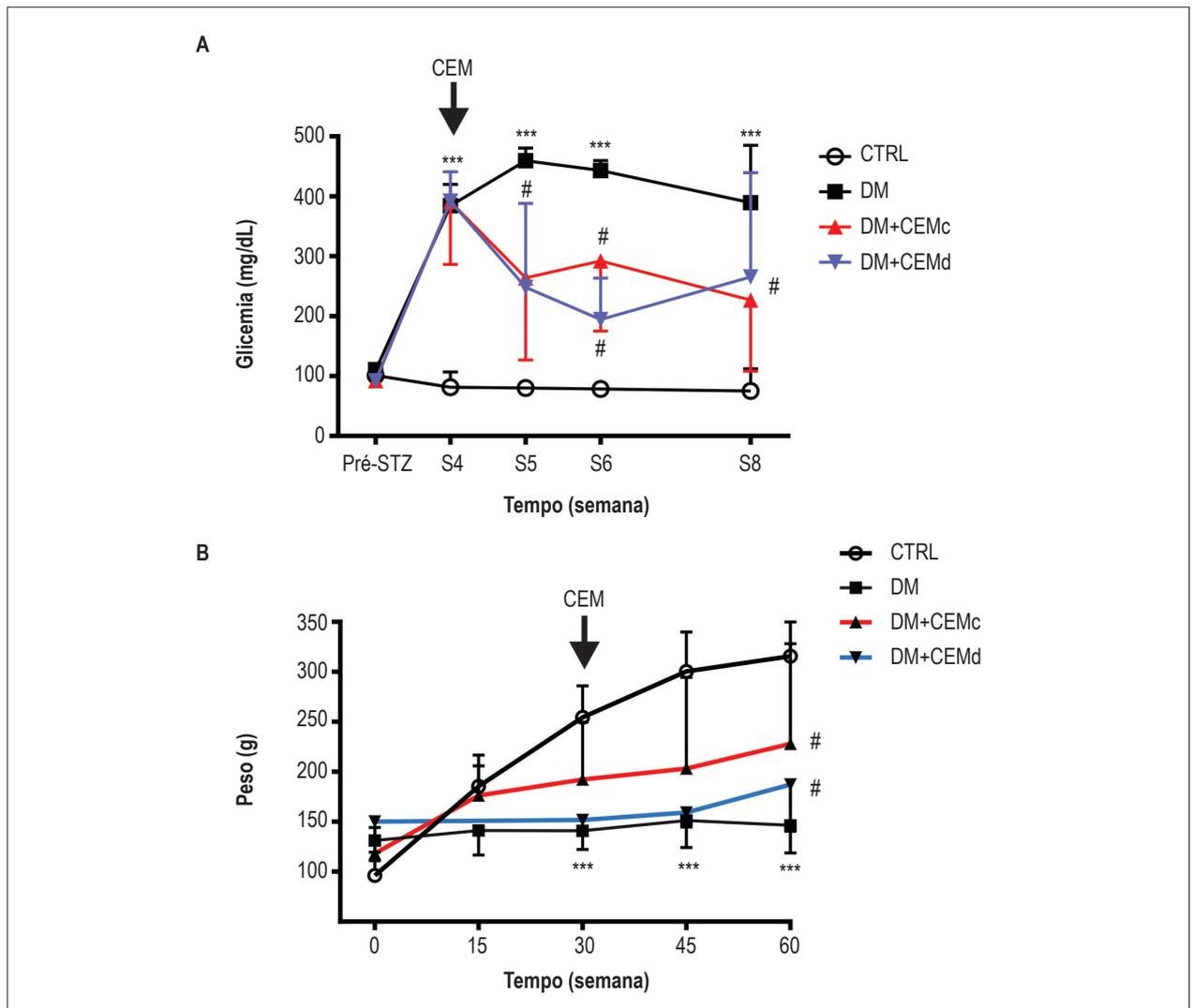


Figura 6 – Perfil metabólico após transplante de CEM. (A) Os níveis de glicemia foram monitorados durante as 8 semanas do protocolo. Ambos os tipos celulares melhoraram os níveis de glicose em comparação com placebo, mas foram incapazes de restaurar os níveis de glicose para os níveis observados nos animais do grupo controle. (B) Melhora do peso corporal durante os 60 dias do protocolo. Ambos os tipos celulares foram capazes de aumentar o peso corporal dos animais 30 dias após a injeção das células quando comparados com placebo, mas foram incapazes de restaurar seus pesos até os níveis dos animais do grupo controle. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (DP), *** representa $p < 0,001$ versus CTRL; # representa $p < 0,05$ versus DM e $p < 0,01$ versus CTRL.

maior potencial clonogênico do que as derivadas de animais saudáveis. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos em um estudo anterior no qual os autores demonstraram que o número total de UFC-F em ratos Wistar diabéticos machos foi mais elevado quando comparado ao de ratos não diabéticos 4 semanas após o estabelecimento do diabetes.³⁴ Considerando que a habilidade de gerar clones se correlaciona com a quantidade de células-tronco na amostra original, nossos dados sugerem que ratos diabéticos têm um maior número de CEM do que ratos saudáveis.

Os efeitos metabólicos benéficos atribuídos à terapia com CEM de animais saudáveis em um modelo animal diabético foram bem demonstrados pelo nosso e vários outros grupos.^{7,22,25,35} Nossos achados mostram que

as CEM obtidas de ratos diabéticos também foram capazes de melhorar o perfil metabólico de outros ratos diabéticos, destacando o potencial terapêutico dessas células. Como mencionado, as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes são as complicações cardiovasculares.²⁻⁴ Assim, um estudo prévio do nosso grupo teve o objetivo de investigar se as CEM de ratos não diabéticos reverteriam as alterações elétricas cardíacas induzidas pelo diabetes. Os resultados obtidos demonstraram que as CEMc foram capazes de melhorar os distúrbios elétricos cardíacos induzidos pelo diabetes.⁷ Alinhados com estes resultados, os dados apresentados aqui demonstraram que as CEMd também são capazes de resgatar as propriedades do potencial de ação cardíaco comprometido pela condição diabética.

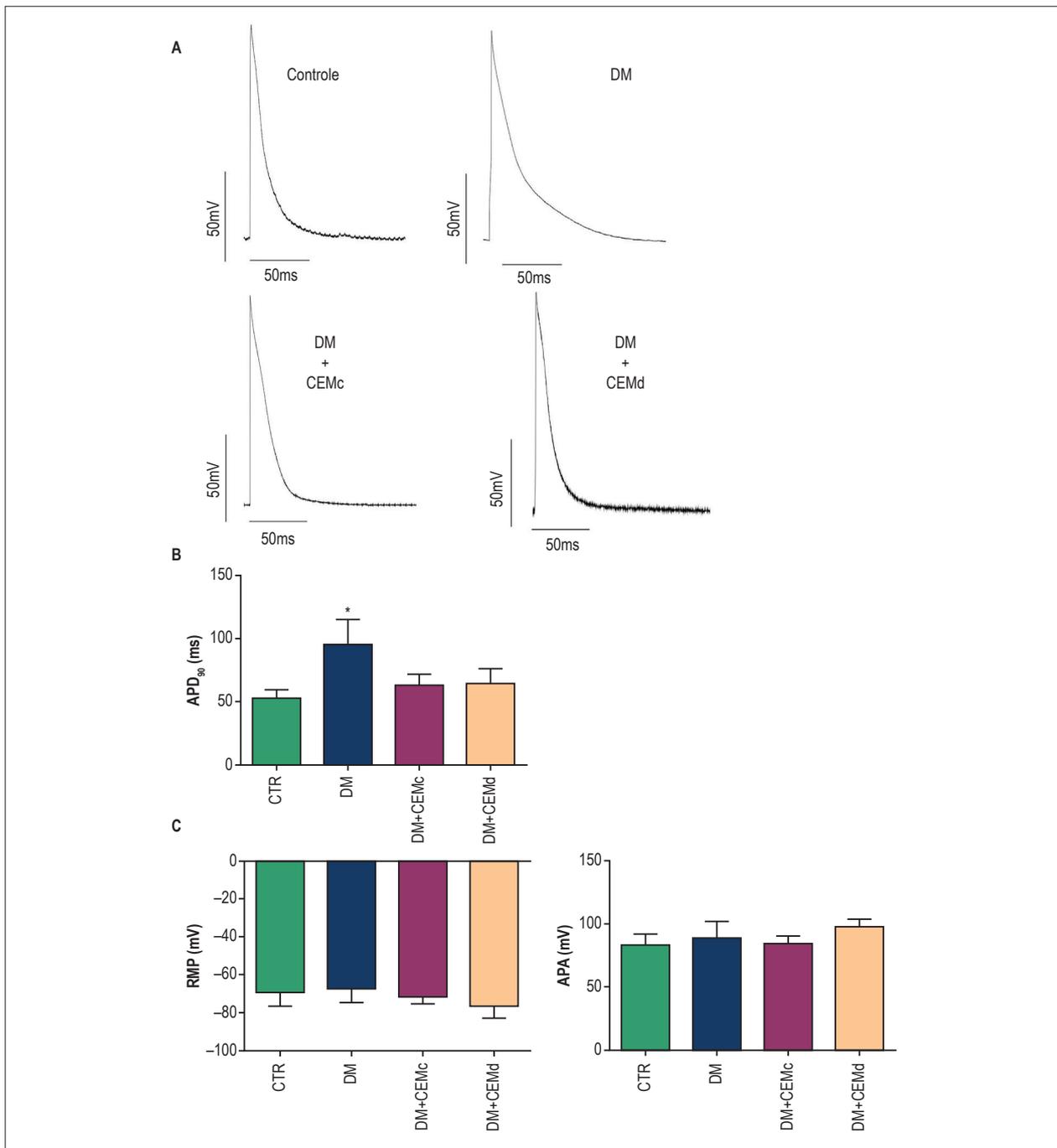


Figura 7 – CEMc e CEMd melhoraram o remodelamento cardíaco 4 semanas após o transplante de CEM. (A) Traçados do potencial de ação de tecido endocárdico do ventrículo esquerdo representativos de todos os grupos experimentais. (B) Duração do potencial a 90% de repolarização (APD_{90}). (C) Potencial de repouso da membrana (RMP) e amplitude do potencial de ação (APA), respectivamente. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (DP) e *** representa $p < 0,01$ versus outros grupos.

Embora o presente estudo tenha potencial translacional, algumas limitações devem ser consideradas. Em primeiro lugar, o modelo animal de diabetes tipo 1 utilizado neste estudo não mimetiza exatamente a doença que ocorre em humanos. Segundo, a corrente de íons que contribui com a repolarização ventricular em ratos é diferente da presente em humanos. Terceiro, a via utilizada para injetar o veículo no

presente estudo (retro-ocular) certamente não seria apropriada para fins translacionais.

Conclusões

Nós caracterizamos e demonstramos várias semelhanças entre CEMc e CEMd de ratos. Apesar das CEMd terem um

potencial clonogênico superior, ambos os tipos celulares apresentaram capacidade de restaurar os níveis de glicemia e o peso corporal. Além disso, ambas as células foram capazes de reverter o prolongamento do AP cardíaco induzido pelo diabetes. Os dados *in vivo* e *in vitro* combinados demonstram que CEM de animais diabéticos podem ser uma opção para transplante em modelos animais diabéticos, indicando uma potencial aplicação também em humanos.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: José VSS, Monnerat G, Medei E; Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados, Análise estatística: José VSS, Monnerat G, Guerra B, Paredes BD, Kasai-Brunswick TH, Medei E; Obtenção

de financiamento: Carvalho ACC, Medei E; Redação do manuscrito: José VSS, Monnerat G, Carvalho ACC, Medei E; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Monnerat G, Carvalho ACC, Medei E.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq e FAPERJ.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de Conclusão de graduação de Vitória Santório de São José pelo Instituto federal do Rio de Janeiro.

Referências

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539-53. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S.
2. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia.* 2001;44 Suppl 2:S14-21. PMID: 11587045.
3. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 1999;100(10):1134-46. PMID: 10477542.
4. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes.* 1974;23(2):105-11. PMID: 4359625.
5. Kahn JK, Sisson JC and Vinik AI. QT interval prolongation and sudden cardiac death in diabetic autonomic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(4):751-4. doi: 10.1210/jcem-64-4-751.
6. Coutinho DC, Monnerat-Cahli G, Ferreira AJ, Medei E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. *Europace.* 2014;16(11):1689-96. doi: 10.1093/europace/euu070.
7. Monnerat-Cahli G, Trentin-Sonoda M, Guerra B, Manso G, Ferreira AC, Silva DL, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells rescue cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Cardiol.* 2014;171(2):199-208. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.12.013.
8. Figueira MF, Monnerat-Cahli G, Medei E, Carvalho AB, Morales MM, Lamas ME, et al. MicroRNAs: potential therapeutic targets in diabetic complications of the cardiovascular and renal systems. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;211(3):491-500. doi: 10.1111/apha.12316.
9. Torres-Jacome J, Gallego M, Rodríguez-Robledo JM, Sanchez-Chapula JA, Casis O. Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes. *Acta Physiol (Oxf).* 2013;207(3):447-59. doi: 10.1111/apha.12043.
10. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells.* 2011;29(1):5-10. doi: 10.1002/stem.556.
11. Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, et al. Mesenchymal stem cells: stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 2009;35(2):85-93. doi: 10.1016/j.diabet.2008.10.003.
12. Friedenstein AJ, Latzinik NV, Gorskaya YuF, Luria EA, Moskvina IL. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner.* 1992;18(3):199-213. PMID: 1392694.
13. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 2009;132(5):533-46. doi: 10.1007/s00418-009-0629-6.
14. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4. PMID: 9082988.
15. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens.* 2007;69(1):1-9. doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00739.x.
16. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther.* 2012;20(1):14-20. doi: 10.1038/mt.2011.211.
17. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006;440(7081):237-41. doi: 10.1038/nature04516.
18. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(10):1732-44. doi: 10.1681/ASN.2010020143.
19. De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 2011;32(8):373-9. doi: 10.1016/j.it.2011.05.004.
20. Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr Res.* 2012;71(6):626-32. doi: 10.1038/pr.2012.24.
21. Si Y, Zhao Y, Hao H, Liu J, Guo Y, Mu Y, et al. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes.* 2012;61(6):1616-25. doi: 10.2337/db11-1141.
22. Katuchova J, Tothova T, Farkasova Iannaccone S, Toporcer T, Harvanova D, Hildebrand T, et al. Impact of different pancreatic microenvironments

- on improvement in hyperglycemia and insulin deficiency in diabetic rats after transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cells. *J Surg Res.* 2012;178(1):188-95. doi: 10.1016/j.jss.2012.02.028.
23. Schu S, Nosov M, O'Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2012;16(9):2094-103. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01509.x.
24. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):1299-310. doi: 10.1007/s00395-011-0221-9.
25. Ezquer F, Ezquer M, Contador D, Ricca M, Simon V, Conget PA. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. *Stem Cells.* 2012;30(8):1664-74. doi: 10.1002/stem.1132.
26. Ezquer F, Ezquer M, Simon V, Conget P. The antidiabetic effect of MSCs is not impaired by insulin prophylaxis and is not improved by a second dose of cells. *PLoS One.* 2011;6(1):e16566. doi: 10.1371/journal.pone.0016566.
27. Monnerat-Cahli G, Alonso H, Gallego M, Alarcón ML, Bassani RA, Casis O, et al. Toll-like receptor 4 activation promotes cardiac arrhythmias by decreasing the transient outward potassium current (I_{to}) through an IRF3-dependent and MyD88-independent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Nov;76:116-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.012.
28. Morigi M, Rota C, Remuzzi G. Mesenchymal stem cells in kidney repair. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:89-107. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_5.
29. Zhou JY, Zhang Z, Qian GS. Mesenchymal stem cells to treat diabetic neuropathy: a long and strenuous way from bench to the clinic. *Cell Death Discov.* 2016 Jul 11;2:16055. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.55.
30. Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014 Jun 6;5:86. doi: 10.3389/fendo.2014.00086.
31. Yaochite JN, de Lima KW, Caliar-Oliveira C, Palma PV, Couri CE, Simões BP, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus exhibit preserved in vitro and in vivo immunomodulatory properties. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Jan 18;7:14. doi: 10.1186/s13287-015-0261-4.
32. Davies LC, Alm JJ, Heldring N, Moll G, Gavin C, Batsis I, et al. Type 1 Diabetes Mellitus donor mesenchymal stromal cells exhibit comparable potency to healthy controls in vitro. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(11):1485-1495. doi: 10.5966/sctm.2015-0272.
33. Stolzing A, Bauer E, Scutt A. Suspension cultures of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level. *Stem Cells Dev.* 2012;21(14):2718-23. doi: 10.1089/scd.2011.0406.
34. Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2010;191(6):453-65. doi: 10.1159/000281826.
35. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(46):17438-43. doi: 10.1073/pnas.0608249103.