



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeito de medicamentos imunossupressores na viabilidade e funcionalidade
de células-tronco mesenquimais**

Autora

Natália Schneider

Orientadora

Prof^a. Dra. Luise Meurer

Coorientadora

Prof^a. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

2012

Artigo científico formatado de acordo com a revista World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics.

Página Inicial

Título: Efeito de medicamentos imunossupressores na viabilidade e funcionalidade de células-tronco mesenquimais

Título Curto: Medicamentos imunossupressores e células-tronco mesenquimais

Autores: Natália Schneider, Fabiany da Costa Gonçalves, Eduardo Pandolfi Passos, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Ana Helena da Rosa Paz, Luise Meurer.

Instituição: Natália Schneider, Fabiany da Costa Gonçalves, Eduardo Pandolfi Passos, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Ana Helena da Rosa Paz, Luise Meurer. Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-903, Rio Grande do Sul, Brasil

Contribuições dos autores: Schneider N, Paz AHR, Gonçalves FC e Meurer L desenharam o estudo proposto. Schneider N realizou a pesquisa. Schneider N, Paz AHR e Gonçalves FC participaram da interpretação dos dados. Schneider N, Paz AHR e Gonçalves FC escreveram o artigo. Paz AHR, Meurer L, Passos EP e Cirne-Lima EO supervisionaram o estudo, execução, análise e aprovaram a versão final.

Financiado por: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Correspondência para: Ana Helena da Rosa Paz, MD, Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. anahpaz@gmail.com

Telephone: +55-51-33598989 Fax: +55-51-33598761

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos de drogas imunossupressoras, utilizadas no tratamento de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), em Células-Tronco Mesenquimais (CTMs). CTMs foram isoladas de córion humano e tecido adiposo de camundongos C57BL/6 GFP⁺. A viabilidade celular foi avaliada na presença ou ausência de Azatioprina e Dexametasona nas concentrações 1 μ m e 10 μ m, respectivamente, através de ensaio de MTT em 4 diferentes tempos: 24h, 48h, 72h e 7d. A funcionalidade das CTMs foi avaliada a partir de co-cultivo com linfócitos T, na presença ou ausência das drogas por três dias, e a avaliação foi realizada por ensaio de MTT. A análise estatística foi realizada através do teste *Generalized Estimating Equations* (GEE). As CTMs foram caracterizadas de acordo com o consenso da Sociedade Internacional de Terapia Celular. Nossos resultados indicaram que a droga imunossupressora Azatioprina diminuiu a viabilidade das CTMs coriônicas em 24h. Entretanto, a adição de Dexametasona ao meio de cultivo não resultou em diferença na viabilidade das CTMs coriônicas e murinas. Avaliando-se a funcionalidade, a droga Dexametasona apresentou resultados positivos, uma vez que, em associação com as CTMs inibiu a proliferação de linfócitos de forma significativa. O presente estudo demonstrou que concentrações terapêuticas de Azatioprina e Dexametasona não afetam negativamente a funcionalidade das CTMs, porém, a Azatioprina pode alterar a viabilidade celular e a Dexametasona atua potencializando o efeito imunossupressor das CTMs.

Texto

INTRODUÇÃO

As CTMs estão presentes na medula óssea e em diversos outros tecidos, apresentam grande plasticidade [1] e possuem a capacidade de secretar uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, os quais possuem atividades parácrinas e autócrinas. Estas moléculas agem de forma a suprimir o reconhecimento imune e/ou a expansão das células T e B, ou também auxiliam na reparação tecidual quando atraídas ao local da lesão (*homing*) através de sinais inflamatórios. [2,3] A ausência de reconhecimento pelas células T pode atribuir-se ao fato de CTMs não apresentarem MHC-II ou pela ausência de moléculas co-estimulatórias (B7-1, B7-2, CD40 ou CD40L). [4]

As DII, como a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa, são inflamações crônicas, recorrentes, idiopáticas do trato gastrointestinal e de etiologia desconhecida. A colite ulcerativa caracteriza-se por afetar a região do cólon e do reto, apresentando infiltrado leucocitário na mucosa e ulceração epitelial. Já a DC pode afetar qualquer parte do segmento gastrointestinal e é caracterizada por um processo inflamatório de aspecto granulomatoso. [5] A inflamação nas DII está associada a uma resposta imune irrestrita com aumento anormal da atividade de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias em grande quantidade, ou então pela função deficiente das células Treg. [6,7]

Os tratamentos clínicos atualmente disponíveis incluem agentes imunossupressores, anticorpos monoclonais, corticosteróides, terapia antimicrobiana. [8] Dentre as drogas imunossupressoras, podemos citar a Azatioprina (AZA), um anti-metabólito que tem sido utilizado em transplantes, doenças auto-imunes, uma variedade de doenças glomerulares e bastante aplicado na terapia medicamentosa de DII. O metabólito ativo da AZA, o 6-mercaptopurina, exerce seu efeito imunossupressor através da sua incorporação ao DNA celular, deste modo inibindo a síntese do nucleotídeo purina e a síntese e metabolismo de RNA. [9] Também corticosteróides são imunossupressores

extensivamente utilizados como agentes para tratar de condições inflamatórias. Neste grupo inclui-se a Dexametasona, a qual influencia na inibição da proliferação de linfócitos, sendo amplamente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Estudos demonstram que a Dexametasona tem influência na regulação da expressão do gene NF- κ B, que por sua vez, regula a transcrição de genes de inflamação. [10-12]

Embora existam medicamentos, como os anteriormente mencionados, que podem promover a remissão de picos de inflamação, não existem opções terapêuticas que possam promover a remissão definitiva da inflamação gastrointestinal, dor abdominal e hipersensibilidade visceral. [13] Nesse sentido, a aplicação clínica das CTMs para o tratamento de DII tem sido amplamente estudada. Trabalhos mostram que, através da capacidade de inibir a proliferação de células T e diminuir a inflamação, a aplicação de CTMs derivadas do tecido adiposo resultou em diminuição dos sinais clínicos da doença e aumento da sobrevida em modelo murino de colite. Além disso, também demonstram uma inibição de resposta Th1 e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, havendo uma elevação do nível da citocina anti-inflamatória IL-10 nos animais tratados com células-tronco mesenquimais [14,15]

Entretanto, pouco se sabe sobre as interações das CTMs com as drogas imunossupressoras e anti-inflamatórias utilizadas no tratamento dos pacientes. Estes agentes podem provocar mudanças no compartimento tronco, influenciando não somente a frequência das células-tronco, mas também sua funcionalidade, afetando assim o resultado da terapia celular. CTMs alogênicas, quando expostas às drogas consumidas pelo paciente, podem ter seus efeitos terapêuticos prejudicados por estarem sob o efeito dos medicamentos. O oposto também deve ser considerado, uma vez que a administração de CTMs pode afetar a terapia médica convencional. [16]

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e Cultura de Células-Tronco Mesenquimais

As CTMs foram isoladas de córion humano e de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 GFP⁺ de 6-8 semanas. O córion humano foi obtido de projeto aprovado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (11-0616), após informação e autorização das mães e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Serviço de Bioética do HCPA. Os procedimentos em animais foram realizados conforme a legislação vigente no Brasil, lei 11.794/08 [17], que estabelece Procedimentos para o Uso Científico de Animais e regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e registrado sob o número 12-0082. Após a separação estéril do córion a partir da placenta humana e a retirada do tecido adiposo de camundongos, ambos os tecidos foram digeridos em colagenase tipo I (0,5mg/mL em DMEM 10 mM HEPES) por um período de 1h (córion) ou 30 minutos (tecido adiposo), a 37°C. A enzima foi então inativada pela adição de meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após o isolamento, as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo baixa concentração de glicose (Invitrogen, CA, USA), suplementado com 15 mM Hepes, 10% de SFB (Invitrogen, CA, USA), e solução antibiótica de 100 units/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco, NM, USA) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Depois de transcorridas 24h de cultivo, o meio de cultura foi aspirado e meio fresco foi adicionado. Apresentando 80% de confluência, as células aderentes foram removidas com solução de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco, NM, USA) e então mantidas em DMEM com 10% SFB (meio completo).

Ensaio de Diferenciação Celular

A fim de caracterizar as CTMs em acordo com o Consenso publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, [18] três diferentes procedimentos experimentais foram realizados. Para a diferenciação osteogênica, foi utilizado meio de indução DMEM 15 mM HEPES, suplementado com 10^{-8} mol/L de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Ácido Ascórbico 2-Fosfato (Sigma, MO, USA) e 10 mM/L de β -Glicerolfosfato (Sigma MO, USA) em cultura de CTMs de até 21 dias. A diferenciação osteogênica foi detectada por coloração com Vermelho de Alizarina (Nuclear, SP, Brasil), que cora matriz extracelular rica em cálcio. Já para a diferenciação adipogênica, as CTMs foram cultivadas em DMEM 15 mM HEPES, 10^{-8} mol/L de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Insulina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Indometacina (Sigma, MO, USA). A diferenciação adipogênica foi detectada 21 dias após o início do ensaio de diferenciação por coloração com Oil Red (Sigma, MO, USA), que cora os vacúolos de gordura. Na diferenciação condrogênica, foi utilizado meio DMEM 15mM suplementado com HEPES, 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulina, 10 ng/mL TGF β 1 e 50nM ácido ascórbico 2-fosfato. A detecção da diferenciação foi realizada por coloração com Alcian Blue que possui afinidade pelos grupos aniônicos presentes nos glicosaminoglicanos da matriz extracelular.

Imunofenotipagem

As CTMs devem ser positivas para a expressão de CD44 e CD29 e negativas para a expressão de CD34 e CD11b. Foi realizada a imunofenotipagem dos marcadores CD34 e CD29 das CTMs de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 GFP⁺. Os anticorpos foram utilizados na diluição 1:100. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton & Dickinson, NJ, USA) do Laboratório de Psiquiatria Molecular coordenado pelo Prof. Flávio Kapczinski no CPE do HCPA e os resultados foram analisados no software PAINT-A-GATE.

Drogas Utilizadas

Foram utilizadas as drogas Azatioprina (Sigma Aldrich) na concentração de 1 μ M diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) e Dexametasona (Sigma Aldrich) concentração de 10 μ M diluída em DMEM.

Análise do efeito dos medicamentos sobre as CTMs

Para avaliar o efeito das drogas sobre as células do córion e de camundongos, as CTMs foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de 5000 células/poço e incubadas com os medicamentos em meio de cultura pelos períodos de 24h, 48h, 72h e 7 dias. Para determinar a quantidade de células viáveis, o ensaio MTT foi realizado. Ao final do experimento, o meio de cultura foi trocado por 100 μ L de meio fresco, e 25 μ L de MTT 5mg/mL [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich] em PBS (Phosphate-Buffered Saline) foi adicionado. As CTMs foram incubadas por 4h a 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e a placa foi levada novamente à estufa para secagem. Então, 100 μ L de DMSO foram adicionados e a intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. [16]

Análise da funcionalidade das CTMs pelo co-cultivo com linfócitos T na presença de medicamentos

Estudos relatam que CTMs possuem a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T *in vitro* e *in vivo*. [19,20] A fim de avaliar se o efeito dos medicamentos afetaria a capacidade de imunossupressão das CTMs, foi realizado ensaio de co-cultivo de CTMs com linfócitos T na presença ou ausência das drogas. Linfócitos foram isolados a partir de linfonodos de camundongos C57BL/6 e cultivados em meio RPMI completo (suplementado com SFB 10% e penicilina/streptomicina 1%). Primeiramente as CTMs foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poço e incubadas overnight em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para adesão celular.

Após, foram adicionados os linfócitos T na concentração de 1×10^5 linfócitos/poço, com o mitógeno Concanavalina A (ConA) na concentração de $5 \mu\text{g/mL}$, além dos medicamentos ou veículos em suas devidas concentrações, sendo este o dia zero. As amostras foram incubadas por três dias em 5% de CO_2 a 37°C . [21,22] A análise do experimento foi realizada por MTT.

Análise do efeito da Dexametasona e de meio condicionado sobre a linfoproliferação

A fim de avaliar se o efeito imunossupressor observado no co-cultivo ocorreu devido somente à ação da droga ou à associação da droga às CTMs, foi realizado novo experimento de linfoproliferação na ausência de CTMs. Inicialmente realizamos ensaio de linfoproliferação com a droga Dexametasona. Foram semeados 1×10^5 linfócitos/poço em placa de 96 poços e as amostras foram incubadas por três dias em 5% de CO_2 a 37°C . Os resultados foram analisados por MTT. Alguns estudos relatam que a imunossupressão promovida por CTMs é resultante da liberação de moléculas solúveis no meio de cultivo condicionado. Dessa forma, realizamos ensaio de linfoproliferação utilizando o meio condicionado retirado do cultivo de CTMs de córion humano após 24h de cultura das mesmas na presença de Dexametasona. Foram então semeados 1×10^5 linfócitos/poço em placa de 96 poços e as amostras foram incubadas por três dias em 5% de CO_2 a 37°C . Os resultados foram analisados por MTT.

Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados por média \pm EP, e a análise estatística foi feita medindo-se amostras repetidas por GEE utilizando o programa SPSS (versão 18.0). Os ensaios de viabilidade foram feitos em quadruplicatas em dois experimentos independentes e os ensaios de co-cultivo, linfoproliferação e meio condicionado foram feitos em triplicata de dois animais. Os valores de P menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Ensaio de Diferenciação Celular

O potencial de diferenciação das CTMs de córion humano (Figura 1) e de tecido adiposo de camundongo (Figura 2) foi realizado utilizando protocolos de indução de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Os resultados mostraram potencial de diferenciação adipogênica detectada por coloração com Oil Red, o qual cora vacúolos lipídicos (Figuras 1A e 2A), diferenciação osteogênica detectada por Alizarin Red, o qual cora depósitos de cálcio (Figura 1B e 2B), e diferenciação condrogênica detectada por Alcian Blue, o qual cora os glicosaminoglicanos da matriz extracelular (Figura 1C).

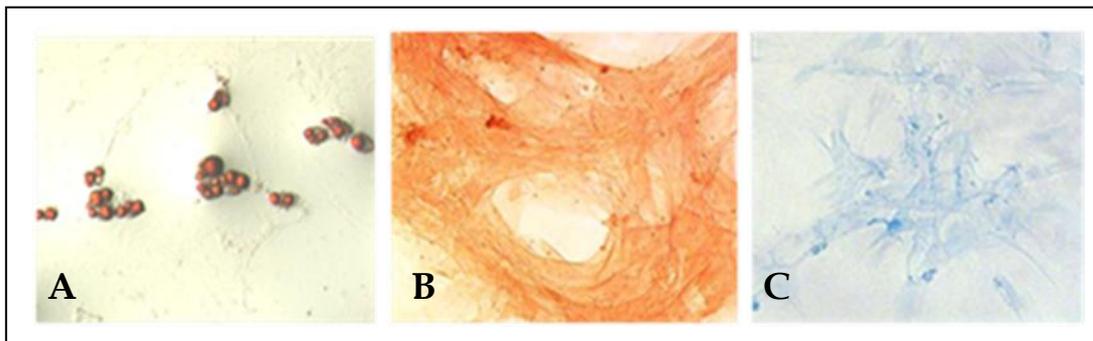


Figura 1. Diferenciação de CTMs de córion humano. (A) Adipogênica em aumento de 40x (B) Osteogênica em aumento de 100x (C) Condrogênica em aumento de 100x.

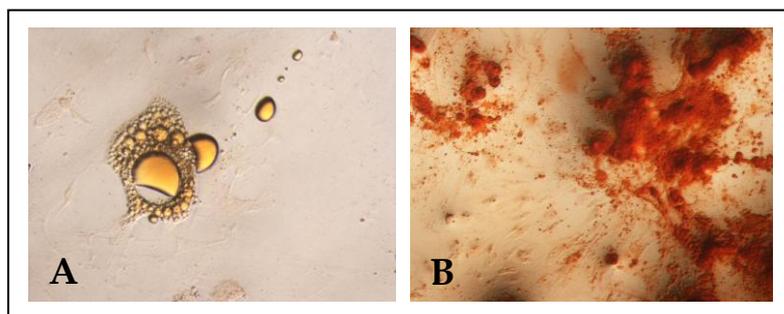


Figura 2. Diferenciação de CTMs de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 GFP⁺. (A) Adipogênica em aumento de 200x (B) Osteogênica em aumento de 100x.

Imunofenotipagem

Foi realizada imunofenotipagem das CTMs de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 GFP⁺ para os marcadores CD34 e CD29. As células

apresentaram marcação positiva para CD29 e marcação negativa para CD34 de acordo com o histograma que segue (Figura 3).

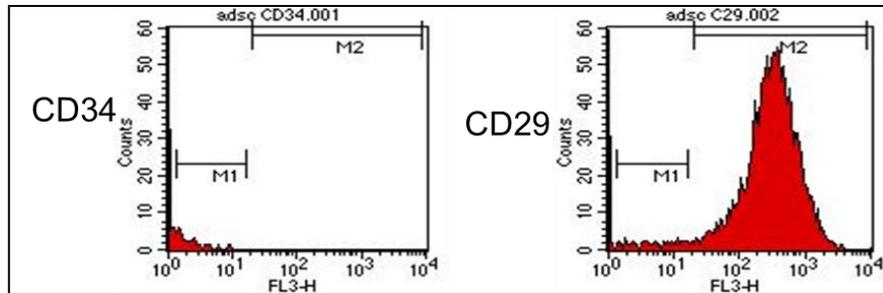


Figura 3. Imunofenotipagem dos marcadores CD34 e CD29 em CTMs murinas. As CTMs não expressam CD34 e expressam CD29, de acordo com o esperado.

Análise do efeito dos medicamentos sobre as CTMs

Na avaliação da viabilidade celular em CTMs de córion humano, houve diferença estatística entre os grupos Azatioprina e Controle em 24h ($0,44 \pm 0,04$ e $0,66 \pm 0,02$, respectivamente; $p < 0,001$). Os outros tempos (48h, 72h e 7d) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), de acordo com a Figura 4.

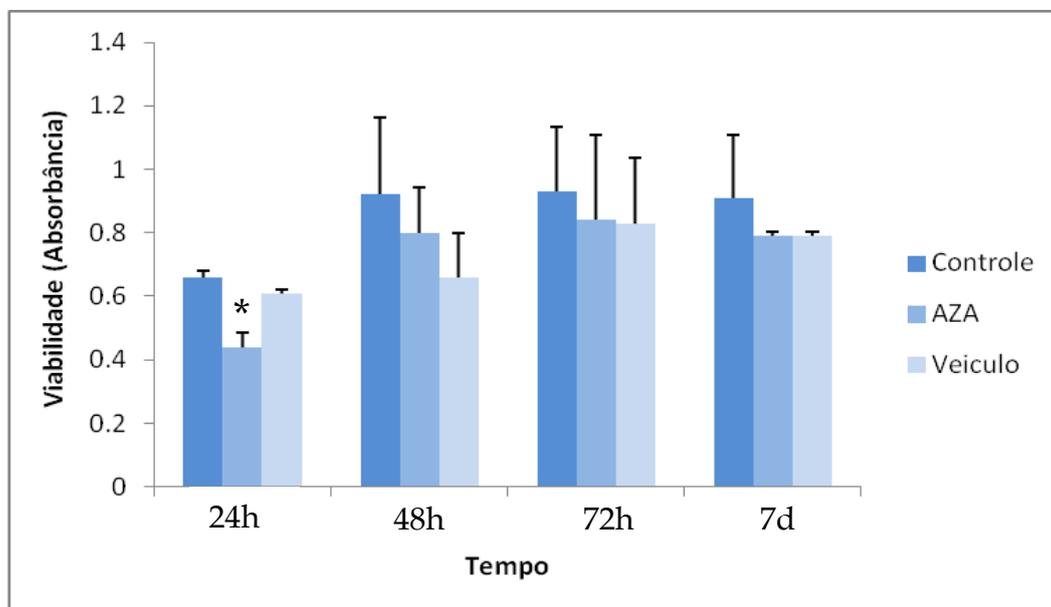


Figura 4. Efeito da Azatioprina sobre a viabilidade das CTMs coriônicas. Foi medida a quantidade de células viáveis nos tempos 24h, 48h, 72h e 7d entre os grupos Controle, Azatioprina (AZA) e Veículo através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). O medicamento diminuiu a viabilidade das CTMs em 24h quando comparado ao Controle (* $p < 0,001$), mas não nos demais tempos ($p > 0,05$).

No grupo Dexametasona (Figura 5) não foi observado efeito significativo ($p>0,05$) sobre a viabilidade celular quando comparado ao controle em nenhum dos tempos de análise (24h, 48h, 72h e 7d).

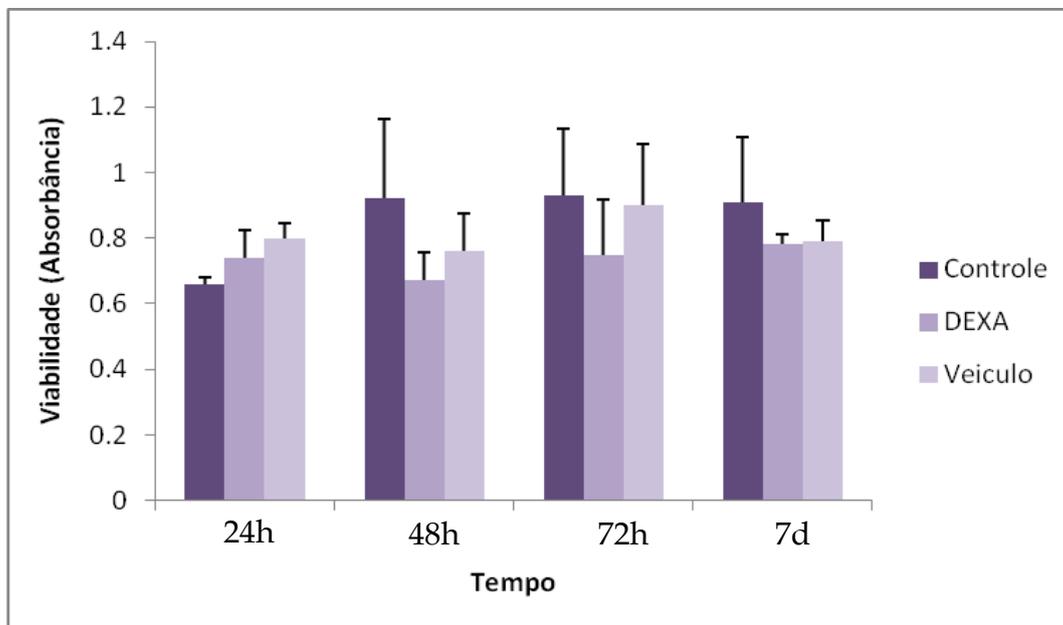


Figura 5. Efeito da Dexametasona sobre a viabilidade das CTMs coriônicas. Foi medida a quantidade de células viáveis nos tempos 24h, 48h, 72h e 7d entre os grupos Controle, Dexametasona (DEXA) e Veículo através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos ($p>0,05$).

No ensaio com CTMs murinas, nenhuma diferença foi vista ($p>0,05$) quando Azatioprina foi adicionada nos diversos tempos de análise (24h, 48h, 72h e 7d), como mostrado na Figura 6.

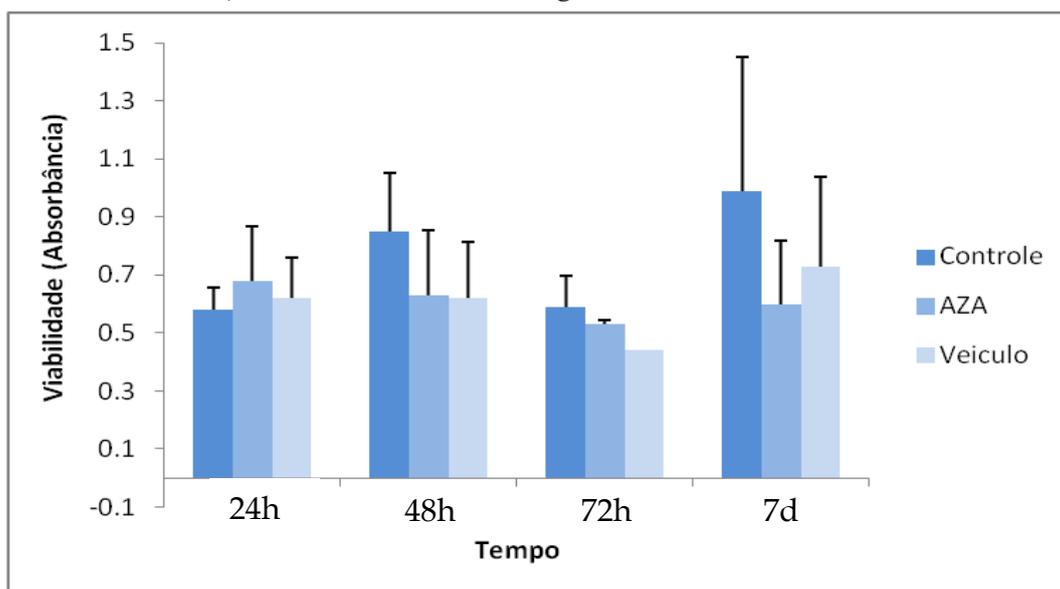


Figura 6. Efeito da Azatioprina sobre a viabilidade das CTMs murinas. Foi medida a quantidade de células viáveis nos tempos 24h, 48h, 72h e 7d entre os grupos Controle, Azatioprina (AZA) e Veículo através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos ($p>0,05$).

Quando o medicamento Dexametasona foi utilizado (Figura 7), o mesmo resultado foi observado ($p>0,05$).

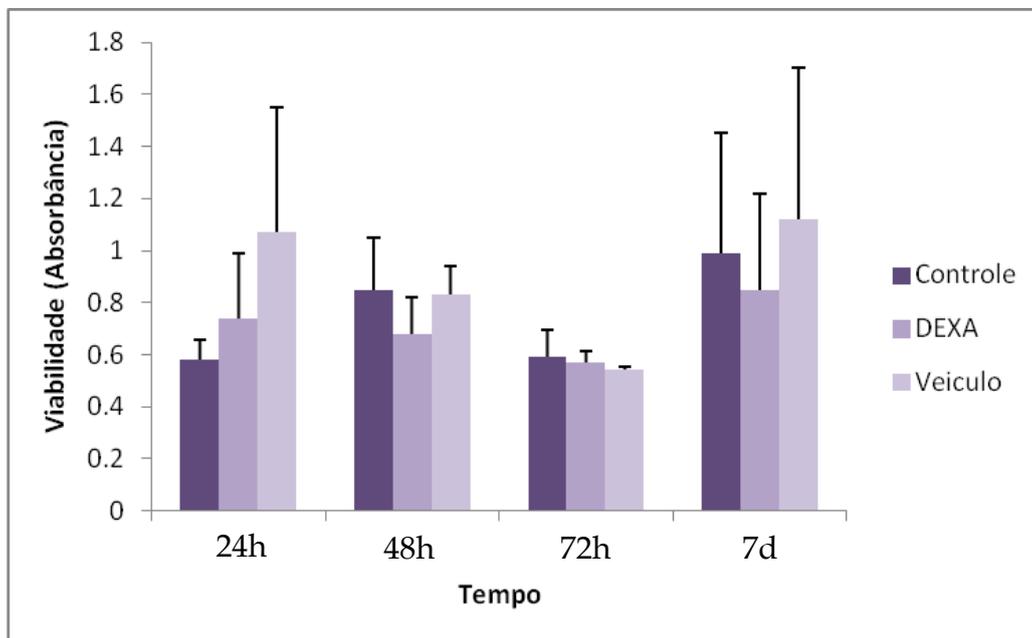


Figura 7. Efeito da Dexametasona sobre a viabilidade das CTMs murinas. Foi medida a quantidade de células viáveis nos tempos 24h, 48h, 72h e 7d entre os grupos Controle, Dexametasona (DEXA) e Veículo através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos ($p>0,05$).

Análise da Funcionalidade das CTMs pelo co-cultivo com linfócitos T na presença de medicamentos

A funcionalidade das CTMs coriônicas foi avaliada pelo co-cultivo das mesmas com linfócitos T, na presença ou ausência dos medicamentos. No grupo Azatioprina foi observada diferença estatística em comparação ao grupo Controle ($0,62\pm 0,008$ e $0,9\pm 0,02$, respectivamente; $p<0,001$), mas não entre o grupo Azatioprina e seu Veículo ($p>0,05$). Entretanto, quando a Dexametasona foi adicionada ao co-cultivo, encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos Dexametasona e Controle ($0,73\pm 0,02$ e $0,9\pm 0,02$, respectivamente; $p<0,001$) (Figura 8).

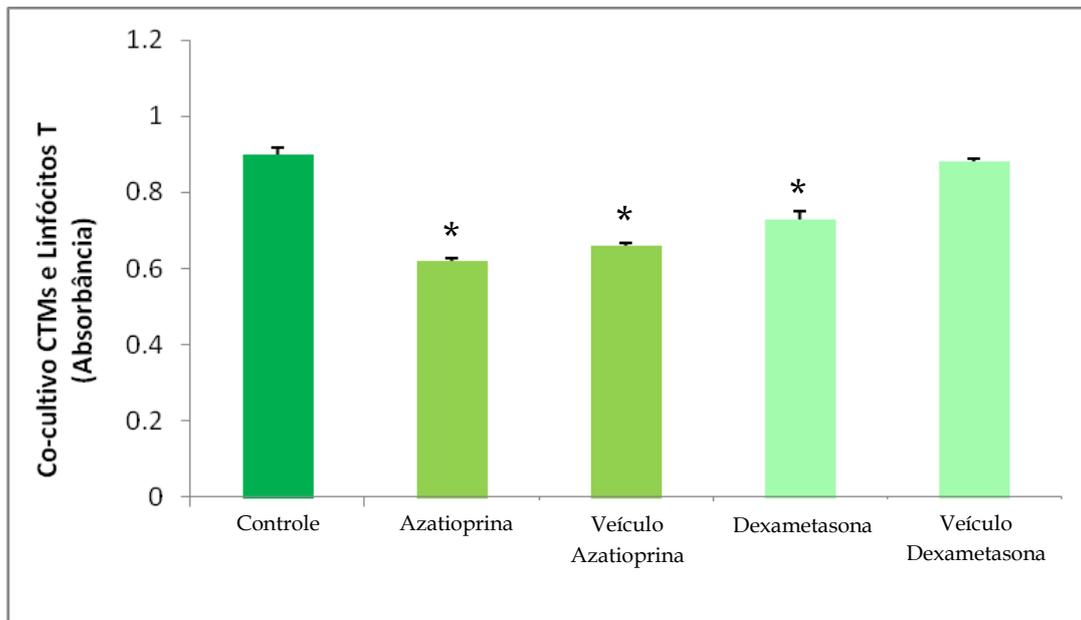


Figura 8. Co-cultivo entre CTMs coriônicas e linfócitos T. Foi avaliado o co-cultivo de CTMs e linfócitos T na ausência ou presença das drogas Azatioprina e Dexametasona no período de três dias através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). Houve uma maior inibição da proliferação de linfócitos nos grupos Azatioprina, veículo da Azatioprina e Dexametasona em comparação ao Controle (* $p < 0,001$). O veículo da Dexametasona não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

Análise do efeito da Dexametasona e de meio condicionado sobre a linfoproliferação

Na análise da linfoproliferação, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada quando a Dexametasona foi adicionada em relação ao Controle ($p > 0,05$) (Figura 9). No ensaio realizado com meio condicionado, também não houve diferença entre os grupos Dexametasona e Controle ($p > 0,05$), como mostrado na Figura 10.

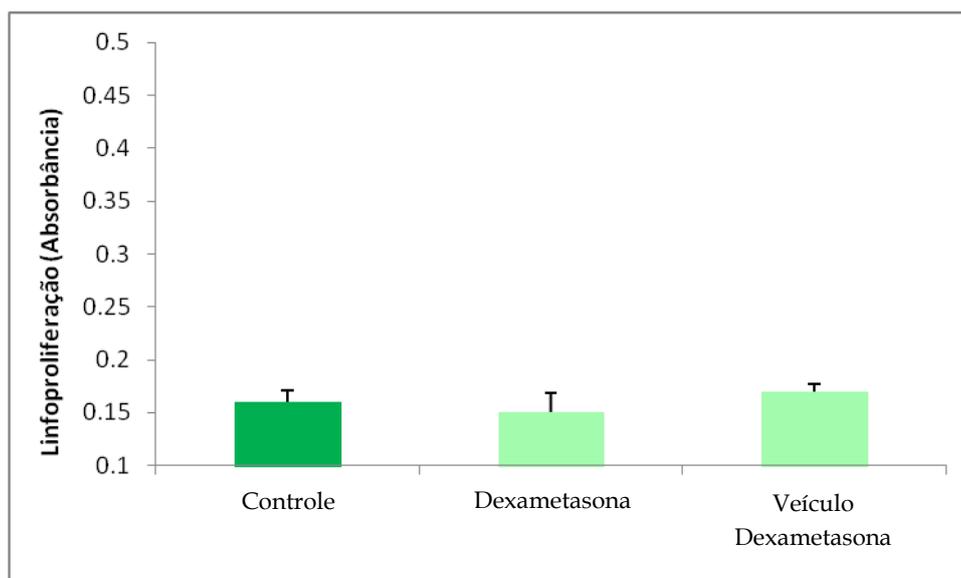


Figura 9. Proliferação de Linfócitos T. Foi avaliada a proliferação de linfócitos T na presença ou ausência de Dexametasona no período de três dias através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

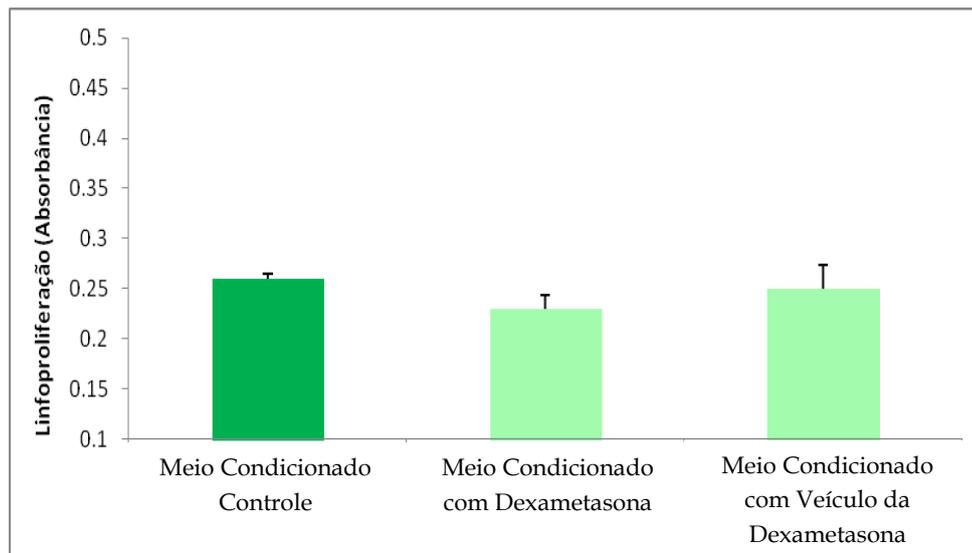


Figura 10. Efeito do meio condicionado na proliferação de linfócitos T. Foi avaliada a proliferação de linfócitos T com meio condicionado, previamente retirado de CTMs coriônicas na presença ou ausência de Dexametasona, no período de três dias através de ensaio de MTT (Absorbância: 570nm). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Atualmente, os métodos de tratamento disponíveis para as DII são limitados a medicamentos, os quais visam a imunossupressão e a manutenção da remissão da doença. Porém, estes fármacos apresentam efeitos colaterais e não são efetivos em todos os pacientes, o que tem direcionado à busca por tratamentos alternativos, como a terapia com células-tronco. Entretanto, para sua utilização clínica, tem se tornado cada vez mais necessário o estudo dessas células associadas a drogas convencionais, pois ainda se desconhece o efeito imunossupressor das CTMs quando administradas em associação à terapia medicamentosa convencional.

Dessa forma, nosso estudo propôs a avaliação do efeito das drogas Azatioprina e Dexametasona, utilizadas no tratamento de DII, sobre as CTMs, a fim de analisar a viabilidade e funcionalidade das mesmas. Visando a terapia celular é importante que estas células não tenham seu desempenho afetado negativamente pelas drogas, pois assim ambos os tratamentos podem ser associados paralelamente em pacientes com DII.

Nossos resultados demonstram que a Dexametasona na concentração de $10\mu\text{M}$ não afeta a viabilidade de CTMs murinas e humanas. Nuzzi e colaboradores (2012) [23] realizaram estudo semelhante testando o efeito de diferentes concentrações de Dexametasona ($25\mu\text{M}$ a $2,5\text{mM}$) em células humanas e concluíram que a droga só tem efeito negativo na viabilidade celular quando em altas concentrações. Nosso trabalho baseou-se na concentração normalmente utilizada ($10\mu\text{M}$) no tratamento de pacientes com DII, sugerindo dessa forma que a associação da terapia celular à terapia medicamentosa com Dexametasona não acarretaria em prejuízo às células.

Na análise do efeito da Azatioprina sobre a viabilidade das CTMs, encontramos efeito negativo da droga nas células coriônicas em 24h, entretanto, não observamos o mesmo resultado nas CTMs murinas. Miura e colaboradores (2006) [24] demonstraram existir diferença entre CTMs de origem murina e humana no que se refere à instabilidade cromossômica e taxa de crescimento,

entretanto não encontramos na literatura disponível estudos que comparem a citotoxicidade de drogas entre estes dois tipos celulares. Podemos especular que as CTMs humanas poderiam ser mais sensíveis ao efeito do metabólito ativo da AZA, o 6-mercaptopurina, que causa a inibição da síntese e metabolismo de RNA. ^[9] Essa diferença também poderia estar relacionada à menor concentração celular no momento da análise, visto que, com o decorrer do experimento e a consequente proliferação celular, tal efeito não foi observado. Nos demais tempos de análise (48, 72h e 7 dias) nossos dados corroboram com o trabalho de Duijvestein *et al* (2011), ^[16] o qual demonstrou não haver efeito citotóxico sobre a viabilidade das CTMs com a droga imunossupressora Azatioprina.

Sabe-se que as CTMs desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuam no sistema imunológico e modulam a resposta imune. ^[20,25,26] Esses fatores solúveis, muitas vezes citocinas anti-inflamatórias, podem diminuir a proliferação de linfócitos T e B, células dendríticas e células NK (natural killer). ^[27] Desse modo, avaliamos o efeito das drogas na capacidade imunossupressora de CTMs humanas, e observamos que os co-cultivos de linfócitos e CTMs tratados com Azatioprina apresentaram uma diminuição da linfoproliferação em relação ao controle. Entretanto, não houve diferença estatística entre as amostras tratadas com a droga e as tratadas com o seu veículo (DMSO), sugerindo que esta diminuição da linfoproliferação tenha sido causada pela toxicidade do veículo e não pela droga em associação com as CTMs.

Em relação ao ensaio de co-cultivo de CTMs e linfócitos com a droga Dexametasona, foi observada uma diminuição na proliferação de linfócitos T no período de três dias. A fim de elucidar-se se o efeito da Dexametasona foi diretamente sobre os linfócitos ou se a droga teve seu efeito direto na funcionalidade das CTMs, realizamos ensaio de linfoproliferação na ausência de células-tronco mesenquimais. Neste ensaio não foi observada diferença entre o grupo controle e o grupo Dexametasona. Dessa forma, podemos postular que

a droga potencializou o efeito imunossupressor das CTMs, promovendo talvez uma maior liberação de citocinas. Nossos dados divergem do trabalho de Duijvestein *et al* (2010) [28] em que a Dexametasona foi testada no co-cultivo de células e não houve diferença no efeito imunossupressor da droga quando as CTMs foram adicionadas. Nossos dados vão de encontro aos resultados obtidos por Hoogduijn *et al* (2008), [29] que demonstrou que o medicamento Tacrolimus potencializou o efeito imunossupressor das CTMs de tecido cardíaco. Nesse trabalho, as CTMs foram previamente incubadas com a droga e então adicionadas à linfoproliferação, resultando numa maior inibição da proliferação de linfócitos. Devido a estes resultados, sugere-se que medicamentos imunossupressores em conjunto com as CTMs poderiam aprimorar os tratamentos convencionais atualmente disponíveis.

Acredita-se que o efeito terapêutico de CTMs esteja relacionado diretamente à ação parácrina, ou seja, à liberação de fatores solúveis que atuam no microambiente diminuindo a inflamação e induzindo a regeneração tecidual. Nesse sentido, mais de 50 moléculas já são conhecidas por mediar a ação parácrina das CTMs. Estudos demonstram que dentre as citocinas solúveis produzidas pelas mesenquimais estão as citocinas anti-inflamatórias, desta forma, o meio condicionado produzido por essas células tem efeito imunossupressor [27,25,30]. Neste sentido, realizamos ensaio de linfoproliferação com meio condicionado produzido por CTMs na presença de Dexametasona e não foi observada diferença significativa entre o grupo Controle (meio condicionado de CTMs na ausência de Dexametasona) e grupo Dexametasona (meio condicionado de CTMs na presença de Dexametasona). Portanto, podemos concluir que a potencialização do efeito imunossupressor das CTMs, ocasionada pela Dexametasona, ocorre quando existe contato entre os linfócitos T e as CTMs. Como previamente visto em outros estudos, o meio condicionado de CTMs tem o papel de induzir um estado anti-inflamatório pelo recrutamento de células do sistema imune de modo a resultar em imunossupressão. [31] Já foi demonstrado que as CTMs têm a capacidade de inibir a proliferação de

linfócitos T *in vitro* e *in vivo*, e através de ensaio de *Transwell* foi observado que esta inibição também ocorre sem o contato celular. Entretanto, ela não é tão eficiente quanto àquela ocorrida através do direto contato celular entre CTMs e linfócitos. [27] Gonzalez-Rey *et al* (2009) [15] demonstrou que somente o meio condicionado de CTMs humanas de tecido adiposo não é capaz de inibir a proliferação de linfócitos T, mas quando as CTMs são estimuladas com as citocinas TNF- α e IFN- γ , este meio condicionado é efetivo. Seus resultados também sugerem que é necessário contato célula-célula corroborando com nossos resultados.

Dessa forma, podemos concluir que concentrações terapêuticas de Azatioprina não afetam negativamente a funcionalidade das células-tronco mesenquimais, entretanto pode alterar a viabilidade de CTMs humanas. No que se refere à Dexametasona, vimos que a droga não afeta a viabilidade celular nos tempos estudados e que a ação da mesma potencializa o efeito imunossupressor das CTMs. Através dos resultados obtidos *in vitro*, poderíamos postular que a terapia medicamentosa com a Dexametasona poderia ser associada à terapia celular sem nenhum prejuízo à ação das CTMs. Esses achados são importantes para o potencial uso clínico das CTMs em combinação com imunossupressores, combinação esta que pode futuramente otimizar o desempenho dos tratamentos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nardi NB, Meirelles LS. Mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2006, 174: 249–282. PMID: 16370331
2. Mokbel A. N, El Tookhy O. S, Shamaa A. A, Rashed L. A, Sabry D, El Sayed A. M. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011, 12:259. PMID: 22085445
3. Caplan A. I, Dennis J. E. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* 98:1076–1084 (2006). PMID: 16619257
4. Jorgensen C, Djouad F, Apparailly F, Noël D. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Therapy* 2003, 10: 928–931. PMID: 12732877
5. Damiani CR, Benetton CAF, Stoffel C, Bardini KC, Cardoso VH, Di Giunta G, et al. Estresse oxidativo e metabolismo em modelo animal de colite induzida por dextran sulfato de sódio. *Dissertação (Mestrado). Criciúma (RS): Curso de Pós-Graduação: Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2006.*
6. Podolsky D. K. Inflammatory Bowel Disease. *The New England Journal of Medicine*. Sept. 26, 1991. PMID: 1881418
7. Bouma G, Strober W. The Immunological and Genetic Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature Reviews, Immunology*. 2003 - 3(7):521-33. PMID: 12876555
8. Singh UP, Singh NP, et al. Stem cells as potencial therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Frontiers Bioscience (Schol Ed)* 2011, 2: 993–1008. PMID: 20515838
9. Pham PT, Pham PC. The impact of mycophenolate mofetil versus azathioprine as adjunctive therapy to cyclosporine on the rates of renal

- allograft loss due to glomerular disease recurrence. *Nephrol Dial Transplant* (2011) 0: 1–7. PMID: 22207327
10. Liu L, Yuan S, Long Y, Guo Z, Sun Y, Li Y, Niu Y, Li C, Mei Q. Immunomodulation of Rheum tanguticum polysaccharide (RTP) on the immunosuppressive effects of dexamethasone (DEX) on the treatment of colitis in rats induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid. *International Immunopharmacology* 9 (2009) 1568–1577. PMID: 19788936
 11. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477–484. PMID: 9616307
 12. Creed T. J, Lee R. W, Newcomb P. V, di Mambro A. J, Raju M, Dayan C. M. The Effects of Cytokines on Suppression of Lymphocyte Proliferation by Dexamethasone. *J Immunol* 2009;183;164-171. PMID: 19542427
 13. Zhou Q, Price DD, et al. Localized colonic stem cell transplantation enhances tissue regeneration in murine colitis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2012, 16(8): 1900-1915. PMID: 22050903
 14. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009, 136:978–989. PMID: 19135996
 15. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009, 58:929–939. PMID: 19136511
 16. Duijvestein M, Molendijk I, Roelofs H, Vos ACW, Verhaar AP, Reinders MEJ, Fibbe WE, Verspaget HW, BRINK GRVD, Wildenberg ME, Hommes DW. Mesenchymal stromal cell function is not affected by drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytotherapy*, 2011; 13: 1066–1073. PMID: 21846292
 17. BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de

- 8 de maio de 1979; e dáoutras providências. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 08de out. de 2008.
- 18.** Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Corthenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005, 7:393-395. PMID: 16236628
 - 19.** Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363: 1439-41. PMID: 15121408
 - 20.** Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005, 105: 1815-1822. PMID: 15494428
 - 21.** Zheng Z. H, Li X. Y, Ding J, Jia J. F, Zhu P. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008;47:22-30. PMID: 18077486
 - 22.** Zabel M, Greenwood C, Thackray A. M, Pulford B, Rens W, Bujdoso R. Perturbation of T-cell development by insertional mutation of a PrP transgene. 2008 Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 127, 226-236. PMID: 19143847
 - 23.** Nuzzi R, Gunetti M, Rustichelli D, Roagna B, Bardelli FF, Fagioli F, Ferrero I. Effect of In Vitro Exposure of Corticosteroid Drugs, Conventionally Used in AMD Treatment, on Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*. Volume 2012 (2012), Article ID 946090, 11 pages. doi:10.1155/2012/946090 PMID: 22693520
 - 24.** Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow

- mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006 Apr; 24(4):1095-103. Epub 2005 Nov 10. PMID: 16282438
- 25.** Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (2009), 419–427. PMID: 19926330
- 26.** Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for type 1 Diabetes. *Diabetes* 2008, 57: 1759–1767. PMID: 18586907
- 27.** Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002, 99: 3838-3843. PMID: 11986244
- 28.** Duijvestein M, Vos ACW, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 2010, 59: 1662-1669. PMID: 20921206
- 29.** Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, Peeters AMA, Eijken M, Maat LPWM, Balk AHMM, Weimar W, Baan CC. Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells to Tacrolimus, Mycophenolic Acid, and Rapamycin. *Transplantation* 2008;86: 1283–1291. PMID: 19005411
- 30.** Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells and Increases IL-10 Secretion. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2012, Article ID 295167, 8 pages. doi:10.1155/2012/295167. PMID: 23251077
- 31.** Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental

colitis and sepsis. *Gut* (2012). doi:10.1136/gutjnl-2012-302152. PMID:
22637701