

Fernanda Otesbelgue Pinto^{1,2}, Ana Helena da Rosa Paz^{1,2,3}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular HCPA;

³Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Introdução

A colite ulcerativa (UC) é uma inflamação crônica, recorrente e idiopática, que afeta a região do cólon e do reto. Estudos indicam uma disfunção do sistema imunológico da mucosa intestinal aos antígenos entéricos em indivíduos geneticamente susceptíveis, caracterizada por infiltrado leucocitário na mucosa, alteração na produção e secreção de citocinas e ulceração epitelial. Os sintomas clínicos mais comuns da doença são diarreia, sangue nas fezes e perda de peso.

As drogas atualmente utilizadas no tratamento da UC visam produzir e manter um estado de remissão, porém não são efetivas em todos os pacientes, apresentando, muitas vezes, efeitos colaterais.

Considerando a capacidade de modular células do sistema imune, regenerar tecidos doentes e migrar a sítios de lesão (*homing*), as células-tronco mesenquimais (CTMs) podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a UC.

Desse modo, a terapia celular com CTMs apresenta-se como uma ferramenta para o melhor entendimento da UC e desenvolvimento de futuras terapias. Entretanto, não há na literatura estudos que demonstrem a melhor via de transplante no tratamento da UC para que as CTMs possam migrar para o cólon inflamado e diminuir a inflamação local.

Objetivo

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do transplante de CTMs derivadas do tecido adiposo em modelo murino de colite ulcerativa aguda induzida por 2% DSS (dextran sulfato de sódio) através de duas vias de infusão: intravenosa e intraperitoneal.

Material e Métodos

- ✓ **Isolamento e caracterização das CTMs:** ensaio de diferenciação celular e citometria de fluxo;
- ✓ **Indução da colite ulcerativa:** 2% de DSS;
- ✓ **Avaliação clínica:** Índice de Atividade da Doença (IAD);
- ✓ **Análise macroscópica:** medição e pesagem do cólon;
- ✓ **Avaliação Histológica:** escore histológico;
- ✓ **Dosagem de citocinas séricas:** perfis Th1/Th2/Th17;
- ✓ **Ensaio TUNEL:** avaliação da apoptose de células T do cólon.

Figura 1. Indução da colite ulcerativa em camundongos C57BL/6 com 2% de DSS do dia 0 ao dia 7 na água de beber. O tratamento foi realizado nos dias 2 e 5 do protocolo, com CTMs ou PBS. No dia 8, os animais foram eutanasiados para a coleta de amostras. (A) Delineamento experimental. O grupo controle recebeu água pura, o grupo DSS recebeu 2% de DSS na água de beber e não foi submetido ao tratamento, o grupo IP recebeu 2% de DSS na água de beber e 10⁶ CTMs pela via intraperitoneal, o grupo IV recebeu 2% de DSS na água de beber e 10⁶ CTMs pela via intravenosa, o grupo salina recebeu 2% de DSS na água de beber e 120µL de solução salina pela via intravenosa. (B) Transplante de CTMs pela via intraperitoneal. (C) Transplante de CTMs pela via intravenosa (veia da cauda).

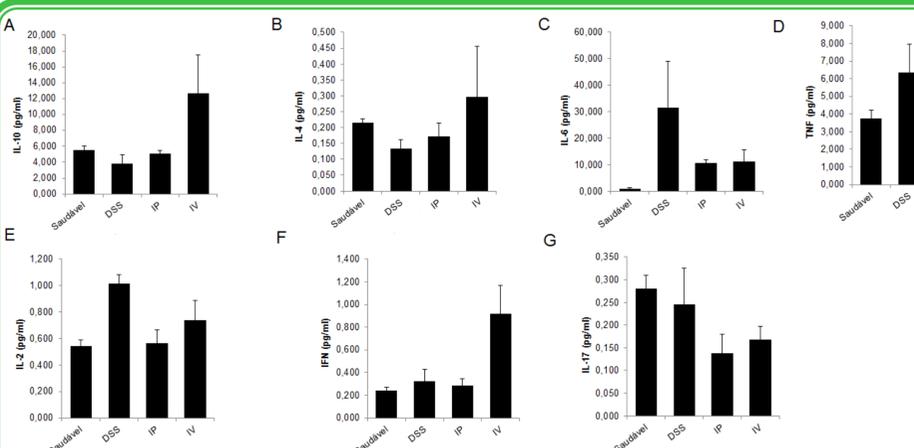
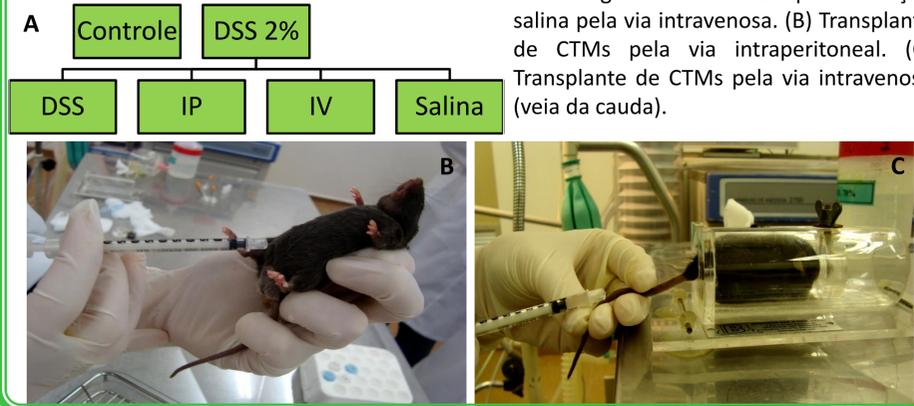


Figura 6. Níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias. (A e B) O grupo IV apresentou níveis mais altos das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 em relação aos outros grupos, apesar dessa diferença não ser significativa. (C) O grupo DSS demonstrou níveis de IL-6 significativamente elevados quando comparados ao grupo saudável. Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, o grupo IV apresentou menores níveis de IL-6 que o grupo DSS não tratado. (D) Os níveis de TNF foram maiores no grupo DSS não tratado, porém não foi estatisticamente significativo. (E) Os níveis de IL-2 não diferem estatisticamente entre os grupos. (F) Os níveis de IFN no grupo IV foram significativamente maiores do que o grupo saudável. (G) Os níveis de IL-17 foram semelhantes entre os grupos. (* $P < 0.005$ vs grupo saudável).

Resultados

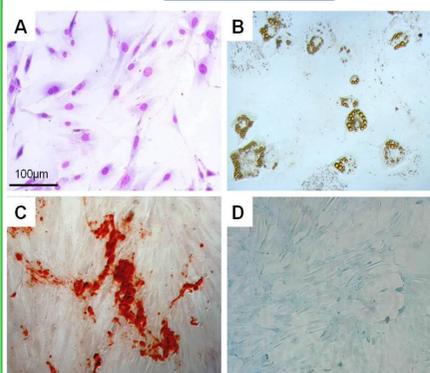


Figura 2. Caracterização das CTMs (A) Morfologia das CTMs, coloração de H&E. (B) Diferenciação em adipócitos, corante Oil Red. (C) Diferenciação em osteócitos, corante Alizarin Red. (D) Diferenciação em condrócitos, corante Alcian Blue. (Barra= 100 µm).

Os resultados da caracterização celular, realizada através da citometria de fluxo, demonstraram que a maioria das células preservou seus fenótipos característicos CD44+, CD90+, CD11bc- e CD34- e foram capazes de manter seu potencial de diferenciação

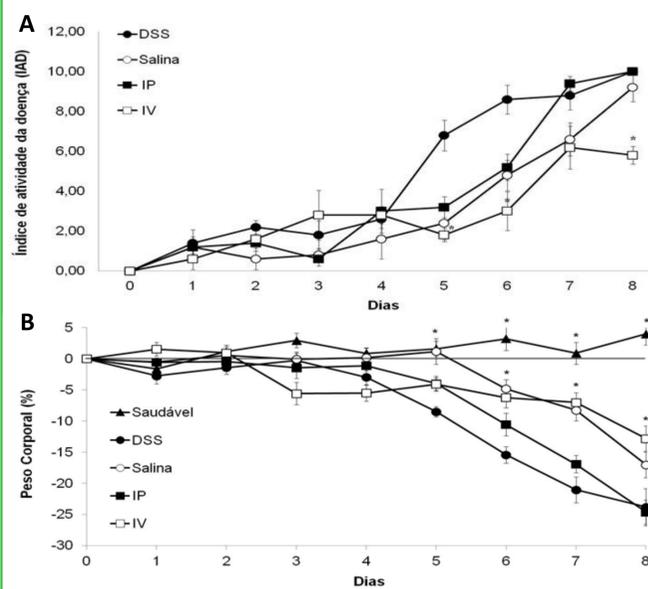


Figura 3. Análise clínica de animais dos diferentes grupos experimentais. O transplante intravenoso de CTMs protegeu contra a colite aguda induzida por DSS. (A) Índice de atividade da doença (IAD). A partir do dia 5, o grupo IV apresentou IAD significativamente menor que o grupo DSS não tratado. (B) Peso corporal. A partir do dia 6, a perda de peso diminuiu significativamente após a administração intravenosa de CTMs em relação ao grupo DSS não tratado. (* $P < 0.001$ vs grupo DSS).

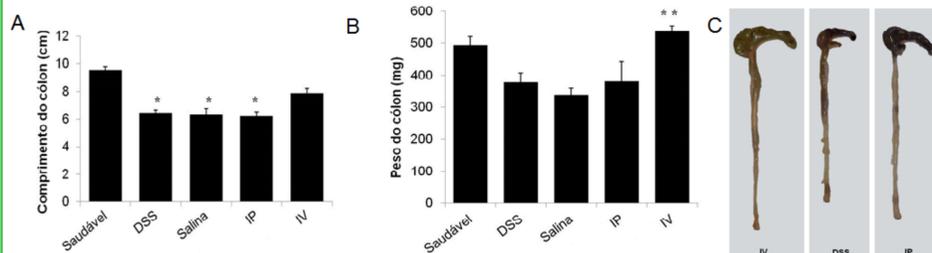


Figura 4. Avaliação macroscópica do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais. (A) Comprimento do cólon. Os grupos DSS, Salina e IP apresentaram comprimento de cólon significativamente menor do que o grupo saudável. (B) Peso do cólon. O Grupo IV apresentou diferença estatística no peso do cólon em comparação ao grupo DSS não tratado. (* $P < 0.001$ vs saudável; ** $P = 0.009$ vs DSS). (C) Fotografia de cólons mostrando a diferença de comprimento dos mesmos.

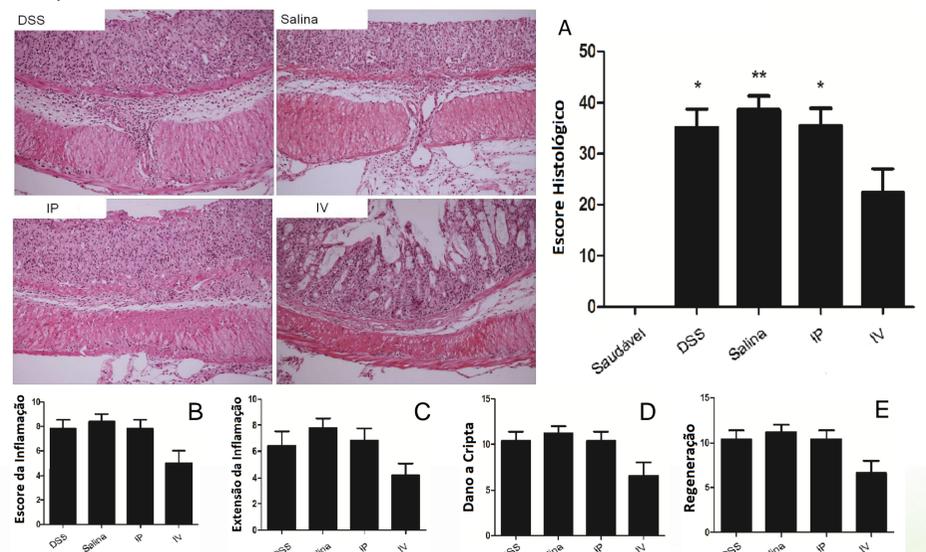


Figura 5. Análise histológica com coloração de H&E (Barra= 200 µm). O tratamento intravenoso de CTMs reduziu a inflamação transmural, a perda de criptas e a infiltração de células inflamatórias. (A) Escore histológico total. A análise histológica mostrou padrão semelhante para os grupos DSS, Salina e IP, mas diferente para IV e controle. (B) Escore da inflamação. (C) Escore da extensão da inflamação. (D) Escore de dano a cripta. (E) Escore de regeneração. (* $P < 0.05$ vs grupo saudável).

Figura 7. A administração intravenosa de CTMs induziu a apoptose de linfócitos T. Taxa de apoptose. Neste modelo de colite ulcerativa induzida por DSS, o número de células mononucleares TUNEL positivo foi maior no grupo IV, quando comparado ao grupo DSS (* $P = 0.027$).

Conclusão

Nossos resultados demonstraram que a administração intravenosa de CTMs foi a melhor via de infusão para a terapia celular no tratamento de colite ulcerativa aguda, apresentando redução da inflamação do cólon e dos sinais clínicos da doença.