

# COMPARAÇÃO DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS ENTRE SECRETOMAS DE CULTURAS 2D E 3D DE CÉLULAS- TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO (CTA) EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1

**Isabelle dos Santos Xavier Dias**

UERJ, BRAZIL, [isabellexdias@gmail.com](mailto:isabellexdias@gmail.com)

**Daphne Pinheiro da Silva**

UERJ, BRAZIL, [daph.note@gmail.com](mailto:daph.note@gmail.com)

**Karina Ribeiro Silva Pereira**

UERJ, BRAZIL, [ribeiro.ks@gmail.com](mailto:ribeiro.ks@gmail.com)

**Ana Carolina Stumbo**

UERJ, BRAZIL, [stumbo.ac@gmail.com](mailto:stumbo.ac@gmail.com)

**Alessandra Thole Erika Cortez**

UERJ, BRAZIL, [aletrole@gmail.com](mailto:aletrole@gmail.com)

**Laís de Carvalho**

UERJ, BRAZIL, [ldcarvalho29@gmail.com](mailto:ldcarvalho29@gmail.com)

**Simone Nunes de Carvalho**

UERJ, BRAZIL, [simonendc@gmail.com](mailto:simonendc@gmail.com)

## INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

**A** Diabetes Mellitus tipo 1 (DT1), é uma desordem na qual as células  $\beta$  pancreáticas são atacadas e destruídas pelo próprio organismo. A insulina, apesar de estender o prazo de vida, muitas vezes não é suficiente para prevenir complicações a longo prazo, como: degeneração vascular, cegueira e falência renal (GRUESSNER; GRUESSNER, 2016).

Recentemente, terapias com células-tronco mesenquimais (CTM) vêm sendo exploradas em estudos clínicos e experimentais no tratamento de doenças como injúrias isquêmicas, infarto do miocárdio, regeneração óssea, desordens imunes (doença de Crohn, esclerose múltipla, lúpus, artrite) entre outras. As células tronco mesenquimais do tecido

adiposo (CTA) apresentam um promissor potencial terapêutico devido à sua capacidade de diferenciação e secreção de uma ampla variedade de citocinas imunomodulatórias. Inicialmente, a regeneração tecidual observada após o transplante de CTM era atribuída, principalmente, à diferenciação dessas células, porém, estudos recentes indicam que o secretoma dessas células desempenha também um papel importante na melhora dos sintomas de doenças (SEVIVAS; TEIXEIRA; PORTUGAL; ARAÚJO *et al.*, 2017). Terapias com células tem algumas limitações, pois há necessidade de expansão *in vitro* para a obtenção de uma quantidade celular adequada, o que pode causar instabilidade genômica e senescência das células, além da possibilidade de ocorrer transformação maligna *in situ* e rejeição imunológica (BAGLIO; PEGTEL; BALDINI, 2012). Uma alternativa seria a utilização do secretoma das células em vez das células-tronco em si, visto que a secreção produzida pelas células é responsável pela maioria dos efeitos benéficos observados.

Um dos métodos estudados para estimular a secreção de fatores imunomodulatórios nas células-tronco é o sistema de cultura tridimensional (3D). Esse tipo de cultura aumentaria a secreção de citocinas anti-inflamatórias em comparação com culturas em monocamada (2D) (MADRIGAL; RAO; RIORDAN, 2014). Portanto, este estudo se propôs a caracterizar o efeito do secretoma das CTA em diferentes condições de cultura (2D e 3D) em modelo experimental de DT1 induzida por estreptozotocina. Foi investigada a capacidade

imunorregulatória dessas células através da análise de citocinas anti- e pró-inflamatórias presentes no secretoma, além do efeito *in vivo* da terapia com o meio condicionado sobre as células do pâncreas. Com isso, visamos contribuir para o esclarecimento sobre o potencial terapêutico das CTA e do seu secretoma em modelo experimental de DT1.

## METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (IBRAG/UERJ) conforme certificado nº CEUA/028/2017.

Para o isolamento das CTA, camundongos Swiss machos (média de 35 g) de 2 meses foram eutanasiados com uso de CO<sub>2</sub> em condições controladas. O tecido adiposo subcutâneo total foi digerido por ação mecânica e enzimática. A fração vascular estromal obtida após centrifugação, foi colocada em garrafas de cultura para crescimento e subcultivo (DIAS; SALVIANO; MENCALHA; DE CARVALHO *et al.*, 2018). Na terceira passagem, as CTA foram transferidas para placas de 96 poços com fundo redondo e previamente revestidas com agarose a 1%. Diferentes densidades de plaqueamento foram feitas (2,5 ou 5,0x10<sup>4</sup> células) a fim de verificar qual seria o melhor tamanho a ser utilizado. As culturas foram mantidas com DMEM + 10% de soro fetal bovino e antibióticos. No 6º dia de cultivo, foi adicionado 200 µL de DMEM sem soro. Para investigar o melhor tempo de condicionamento, o secretoma foi coletado após 24 e 48 horas da troca do meio. Para obtenção de secretoma 2D, CTA foram transferidas para placas de 6 poços em uma densidade de 3,0x10<sup>5</sup> células. No dia seguinte, foi adicionado 2,4 mL de DMEM. Após 24 ou 48 horas o secretoma seguiu para as análises posteriores. A morfologia das células foi analisada por fotografias em microscópio com câmera digital acoplada e o volume dos esferoides foi aferido utilizando software Spheroid Sizer. A viabilidade celular das culturas 2D e 3D foi verificada por citometria de fluxo, utilizando um kit de viabilidade celular (Anexina V e 7AAD) para verificar apoptose e necrose.

A indução da diabetes tipo 1 foi realizada em camundongos Swiss machos de 2 meses (média de 35 g) (FURMAN, 2015). Animais

receberam uma injeção intraperitoneal por dia de estreptozotocina (40mg/kg) ou somente veículo (animais controle) durante 4 dias consecutivos. Após 28 dias da primeira injeção de estreptozotocina, animais com glicemia  $\geq 200$ mg/dL foram subdivididos nos seguintes grupos: STZ (diabéticos), STZ+2D (diabéticos tratados com secretoma 2D) e STZ+3D (diabéticos tratados com secretoma 3D). Grupos STZ+2D e STZ+3D receberam duas injeções intraperitoneais (400  $\mu$ L) de meio condicionado 2D e 3D, respectivamente, nos dias 28 e 29. A glicemia dos animais foi aferida semanalmente durante o experimento. No dia 35, animais foram eutanasiados e os pâncreas coletados para análise. Pâncreas foram lisados para análise do perfil de citocinas Th1/Th17 (IL-10, IL-17 A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2 e IL-4) por citometria de fluxo. Também foi feito processamento histológico para marcação imunohistoquímica de insulina e PDX-1. Os níveis de citocinas e quantificação imunohistoquímica do pâncreas foram analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. A glicemia dos animais em jejum foi analisada por Two-way ANOVA com pós teste de Tukey. As demais análises foram determinadas pelo teste t de Student's não pareado. A diferença estatística significativa entre os grupos foi determinada com valores de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram feitas no software GraphPad Prism 6.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia das culturas 2D e 3D foi observada e a cultura 2D mostrou-se com característica típica fibroblastoide de células-tronco mesenquimais após 24 ou 48 h de cultivo com meio condicionado. Na cultura 3D, esferoides menores tinham mais homogeneidade dentro de seu tamanho como demonstrado por menor desvio padrão. Esferoides com  $2,5 \times 10^4$  células permaneceram menores do que esferoides com  $5,0 \times 10^4$  células durante os oito dias de cultivo. Com o tempo, os esferoides tornaram-se mais compactos. O tamanho dos esferoides manteve sua uniformidade nas duas concentrações, mostrando a reprodutibilidade dos experimentos. Na literatura, existem diferentes resultados quanto à compactação dos esferoides ao longo do tempo de cultivo. No estudo de 2010 por Bartosh, esferoides cultivados pelo método de gota suspensa se compactaram entre 48 e 96 h (BARTOSH; YLÖSTALO; MOHAMMADIPOOR;

BAZHANOV *et al.*, 2010), mas outro estudo mostrou que os esferoides se tornaram maiores com o tempo de cultivo (LEE; HAN; LEE, 2016). Menores esferoides (com  $2,5 \times 10^4$  células) cultivados sem soro por 48 h tiveram maior porcentagem de células viáveis. Estudos anteriores demonstram que a taxa de sobrevivência celular se correlaciona negativamente com o tamanho do esferoide (MURPHY; HUNG; BROWNE-BOURNE; ZHOU *et al.*, 2017). Alguns estudos sugerem que esta baixa viabilidade celular em esferoides maiores seria devido a um centro necrótico (LANGAN; DODD; OWEN; PURCELL *et al.*, 2016). A respeito do tempo de cultivo, o esferoide cultivado por 48 h apresentou maior viabilidade, enquanto na cultura 2D observou-se uma maior sobrevivência celular em 24 h.

O secretoma da cultura 3D com 48 horas de condicionamento e os níveis de IL-6 e IL-2 estavam aumentados, enquanto níveis de IL-4 estavam diminuídos comparados com a cultura 2D. Estudos mostraram que CTM cultivadas em 3D mostraram aumento da secreção de IL-6, e isso seria um fator indutor de angiogênese e melhoraria o potencial antifibrótico (PARK; LEE; BYEON; JEONG *et al.*, 2018). Especificamente em relação a DT1, estudos demonstraram que esta citocina não é citotóxica para células beta e ainda mostra um efeito protetor na linhagem de células beta e ilhotas de camundongos *in vivo*. Porém, alguns dados sugerem que IL-6 produzida pelas células beta poderia contribuir para a patogênese da doença (KRISTIANSEN; MANDRUP-POULSEN, 2005). A IL-2 tem sido avaliada como uma possível alternativa terapêutica para DT1. Ela age em células T efetoras e células T-reg que apresentam receptores de baixa e alta afinidade à citocina, respectivamente. As células T-reg necessitam dessa citocina para seu desenvolvimento e função imunorregulatória, por isso a IL-

2 poderia auxiliar contra o ataque autoimune das células beta. Porém, IL-2 em baixa concentração poderia ser prejudicial pois estimularia as células T efetoras potenciando autoimunidade (HULME; WASSERFALL; ATKINSON; BRUSKO, 2012). O secretoma da cultura 2D apresentou um aumento de IL-4. Estudos mostram que esta citocina tem um perfil protetor na patogênese da DT1 através de uma potencialização de células Th2 (LI; SHI; LIU; SHAO *et al.*, 2019). As demais citocinas (IL-10, IL-17 A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

A glicemia dos animais do grupo STZ +2D foi menor do que a dos animais do grupo STZ+3D uma semana após a aplicação das injeções (dia 35). Apesar desse resultado, não houve diferença significativa da produção de insulina entre o grupo diabético e os grupos tratados com secretoma. Ao analisar a quantidade de PDX-1, houve uma maior expressão dessa molécula nos grupos tratados com secretoma da cultura 2D. Essa molécula age como um fator de transcrição que modula a regeneração e maturação de células beta pancreáticas. Ela se liga ao domínio TATA Box do gene da GLUT-2 (que transporta glicose para dentro da célula), participando assim de sua transcrição. A diminuição da glicemia no grupo STZ+2D pode estar relacionada ao aumento de PDX-1 no pâncreas, uma vez que o transportador GLUT-2 seria um dos genes alvo que são ativados pelo PDX-1, e consequentemente diminuiria os níveis de glicose. A não restauração dos níveis de insulina no grupo STZ+2D poderia ser explicada por um estágio inicial de diferenciação de células beta no qual elas não seriam maduras o suficiente para produzir insulina em níveis detectáveis (DIAS; PINHEIRO; RIBEIRO SILVA; STUMBO *et al.*, 2021).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os dados deste projeto demonstram que o secretoma obtido pelo método de cultivo 3D não diminuiu a glicemia de animais diabéticos. Por outro lado, após uma semana de injeções do secretoma obtido pelo método de cultivo 2D, a glicemia dos animais diabéticos diminuiu e o pâncreas apresentou maior expressão do fator de transcrição PDX-1, sugerindo uma regeneração pancreática. Portanto, essa pesquisa abre novos caminhos na busca de alternativas para o tratamento de DT1 e traz perspectivas em estudos translacionais, embora mais estudos precisem ser feitos para explorar os mecanismos moleculares de ação desta regeneração.

**Palavras-chave:** Secretoma, Cultura 3D, Células-tronco, Diabetes tipo 1.

## REFERÊNCIAS

BAGLIO, S. R.; PEGTEL, D. M.; BALDINI, N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. **Front Physiol**, 3, p. 359, 2012.

BARTOSH, T. J.; YLÖSTALO, J. H.; MOHAMMADIPOOR, A.; BAZHANOV, N. *et al.* Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 31, p. 13724-13729, Aug 2010.

DIAS, I.; PINHEIRO, D.; RIBEIRO SILVA, K.; STUMBO, A. C. *et al.* Secretome effect of adipose tissue- derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. **Curr Res Pharmacol Drug Discov**, 2, p. 100069, 2021.

DIAS, I.; SALVIANO, Í.; MENCALHA, A.; DE CARVALHO, S. N. *et al.* Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. **Stem Cell Rev Rep**, 14, n. 4, p. 535-545, Aug 2018.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Curr Protoc Pharmacol**, 70, p. 5.47.41-20, Sep 2015.

GRUESSNER, A. C.; GRUESSNER, R. W. Long-term outcome after pancreas transplantation: a registry analysis. **Curr Opin Organ Transplant**, 21, n. 4, p. 377-385, Aug 2016.

HULME, M. A.; WASSERFALL, C. H.; ATKINSON, M. A.; BRUSKO, T. M. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. **Diabetes**, 61, n. 1, p. 14-22, Jan 2012.

KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? **Diabetes**, 54 Suppl 2, p. S114-124, Dec 2005.

LANGAN, L. M.; DODD, N. J.; OWEN, S. F.; PURCELL, W. M. *et al.* Direct Measurements of Oxygen Gradients in Spheroid Culture System Using Electron Parametric Resonance Oximetry. **PLoS One**, 11, n. 2, p. e0149492, 2016.

LEE, J. H.; HAN, Y. S.; LEE, S. H. Long-Duration Three-Dimensional Spheroid Culture Promotes Angiogenic Activities of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Biomol Ther (Seoul)**, 24, n. 3, p. 260-267, May 2016.

LI, Z.; SHI, X.; LIU, J.; SHAO, F. *et al.* Artesunate prevents type 1 diabetes in NOD mice mainly by inducing protective IL-4-producing T cells and regulatory T cells. **FASEB J**, 33, n. 7, p. 8241-8248, 07 2019.

MADRIGAL, M.; RAO, K. S.; RIORDAN, N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. **J Transl Med**, 12, p. 260, Oct 2014.

MURPHY, K. C.; HUNG, B. P.; BROWNE-BOURNE, S.; ZHOU, D. *et al.* Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids. **J R Soc Interface**, 14, n. 127, 02 2017.

PARK, M. J.; LEE, J.; BYEON, J. S.; JEONG, D. U. *et al.* Effects of three-dimensional spheroid culture on equine mesenchymal stem cell plasticity. **Vet Res Commun**, 42, n. 3, p. 171-181, Sep 2018.

SEVIVAS, N.; TEIXEIRA, F. G.; PORTUGAL, R.; ARAÚJO, L. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Secretome: A Potential Tool for the Prevention of Muscle Degenerative Changes Associated With Chronic Rotator Cuff Tears. **Am J Sports Med**, 45, n. 1, p. 179-188, 01 2017.