

Utilização do camundongo NOD (Non-obese diabetic) como modelo de estudo sobre a eficácia da autohemoterapia.

Dr. Flávio Alves Lara

Bacharel em Microbiologia

Mestre em Biociências e Biotecnologia

Doutor em Química Biológica

Assistente de Pesquisa do Laboratório de Microbiologia Celular

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

Fica aqui registrado que se trata de um estudo preliminar, que não dá respaldo científico ao uso da ferramenta em humanos. Apesar da sua provável eficácia em um modelo animal clássico de doença autoimune, seu mecanismo de ação e riscos em potencial não são conhecidos.

Endereço:

Flavio Alves Lara

Laboratório de Microbiologia Celular

Pavilhão Hanseníase, sala 27

Av. Brasil 4365 – Manguinhos

Rio de Janeiro – Brasil

CEP: 21045-900

e-mail: falara@ioc.fiocruz.br

Introdução

A linhagem de camundongo NOD (Non-obese diabetic) é largamente utilizada em estudos envolvendo modulação da resposta imune, fisiologia de linfócitos T reguladores e diabetes. Os animais dessa linhagem apresentam o desenvolvimento espontâneo de uma síndrome autoimune, levando em poucas semanas de vida à infiltração linfomononuclear progressiva das ilhotas de Langerhans (insulite), iniciada na quinta semana de vida, levando ao desenvolvimento do quadro clínico de diabetes dependente de insulina (Kikutani e Makino, 1992). A linhagem NOD foi gerada por pesquisadores japoneses através da indução de polimorfismo no locus *Idd3*, associado à produção de IL-2, o que acarreta no desaparecimento da população de linfócitos T reguladores (Makino e cols, 1980). A perda da população de linfócitos responsáveis pela gestão da imunotolerância acarreta em um leque maior de síndromes autoimunes a serem observadas na supracitada linhagem, tais como sialites autoimune, tireoidites autoimune, polineuropatia periférica autoimune e dermatite sistêmica autoimune.

Estudos recentes apontam o papel imunomodulador apresentado por componentes sanguíneos tais como plaquetas e heme (Porto e cols. 2007; Graca-Souza e cols. 2002; Knighton e cols. 1986).

Dessa forma, decidimos no presente estudo fracionar os componentes do sangue em três: fração celular, fração plasmática e fração heme, realizando protocolo semelhante à autohemoterapia em camundongos NOD, observando dessa forma a contribuição individual de cada componente para a imunomodulação já observada durante o tratamento envolvendo a autohemoterapia em humanos (comunicação pessoal). Utilizamos como grupo controle animais injetados com salina tamponada, utilizando-se um total de 20 animais para cada condição.

Metodologia

Frações do sangue

A partir de uma colônia isogênica (mesmo pool genético) de camundongos BalbC NOD, machos foram sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e sangrados com a ajuda de uma seringa contendo heparina como anticoagulante. O sangue foi rapidamente centrifugado a 1000g por 10 minutos, no sentido de separarmos a fração celular (que nas pranchas das figuras 1 e 2 são abreviadas como sangue) e a fração plasmática (que nas figuras 1 e 2 são chamadas de plasma). Ambas as frações são congeladas em freezer para uso posterior.

Solução de Heme

Neste trabalho uma solução de 10mM de heme (Fe-Protoporfirina IX) foi preparada da seguinte forma: heme em pó adquirido da empresa Molecular Products foi resuspenso em solução de NaOH 0.1N, e posteriormente tamponado com PBS (tampão fosfato tamponado a pH 7,2).

PBS

A solução de PBS foi montada através da combinação de soluções contendo 100mM de fosfato de sódio monobásico e dibásico adicionados de 150mM de NaCl até atingir-se o pH 7,2. Todos os sais foram adquiridos da empresa Merck.

Tratamento

O tratamento consistiu de injeções intramusculares de 10µl dos diferentes estímulos (fração celular do sangue, fração plasmática do sangue, heme e PBS) em apenas um dos membros inferiores por vez, a cada 2 semanas, de forma que um mesmo membro recebia injeções a cada 4 semanas. Não foram observados nos animais em questão sinais maiores de desconforto atribuídos ao tratamento. Foram utilizados 20 animais por grupo, iniciando-se o tratamento no segundo mês de vida. Divergências no padrão de dermatite autoimune foram registradas ao longo do período, interrompendo-se o estudo ao sexto mês de vida.

Dessa forma, decidimos no presente estudo fracionar os componentes do sangue em três: fração celular, fração plasmática e fração heme, realizando protocolo semelhante à autohemoterapia em camundongos NOD, observando dessa forma a contribuição

individual de cada componente para a imunomodulação já observada durante o tratamento envolvendo a autohemoterapia em humanos (comunicação pessoal). Utilizamos como grupo controle animais injetados com salina tamponada, utilizando-se um total de 20 animais para cada condição.

Resultados e discussão

Após 4 meses de tratamento, é vivível a diferença entre os animais tratados com injeções contendo a fração celular e plasmática do sangue, quando comparados aos animais tratados com heme e salina (figura 1 e 2). É possível observar regiões de foliculite e dermatite autoimune, evidenciadas por setas. Na região ventral, onde tanto a pele como os folículos pilosos são mais susceptíveis ao ataque autoimune, as diferenças são mais evidentes, tornando clara uma maior eficácia em imunomodulação do tratamento envolvendo a fração celular (sangue), quando comparado aos demais, incluindo-se o tratamento envolvendo a injeção intramuscular da fração plasmática do sangue (plasma).

Os animais que receberam injeções intramusculares contendo a fração celular do sangue apresentaram aspecto normal, semelhante a camundongos selvagens não NOD. Já animais tratados com todos os demais estímulos, apresentaram, mais severamente os grupos controle e heme, arrepiamento de pelo quando estimulados, demonstrando desconforto, letargia, perda de peso e tremores. Não foi observada nenhuma diferença entre o grupo de animais estimulados com heme e o grupo controle, estimulados com salina tamponada.

Os resultados colhidos até o momento apontam para um novo e inesperado mecanismo envolvendo a autohemoterapia. Seria mais lógico supor que o mesmo estivesse diretamente ligado à liberação de heme após a digestão proteolítica da hemoglobina, ativando dessa forma mediadores imunes locais, seja integro ou após ser degradado à bilirrubina, ferro e monóxido de oxigênio. É bem reconhecido seu papel como ativador de migração e geração de radicais livres em neutrófilos (Porto e cols. 2007; Graca-Souza e cols. 2002), assim como seu papel como ativador dos receptores semelhantes a Toll 4 (TLR4) (Figueiredo e cols, 2007).

No entanto, a administração de 100nMoles de heme intramuscularmente não apresentou qualquer efeito no quadro autoimune de animais NOD.

Nos voltamos então para a fração celular do sangue, a única que apresentou forte efeito imunomodulador. Acreditamos que a pouca ação da fração plasmática se deve aos contaminantes presentes da fração celular, que provavelmente se juntam a esta após lise celular proveniente do procedimento de coleta de sangue. Sabemos que o efeito benéfico da fração celular não é proveniente da ação de inoculação de células sanguíneas viáveis no ambiente intramuscular, visto que esta fração foi congelada após seu preparo e descongelada previamente ao uso, procedimento que inviabiliza a existência de células viáveis. É conhecido também que o tratamento prévio do sangue com ozônio, o que acarreta no rompimento de todas as células ali presentes, aumenta sua eficácia como imunomodulador (comunicação pessoal). Dessa forma, acreditamos em um componente protéico presente no interior de alguma população celular presente no sangue como responsável pelos efeitos terapêuticos da autohemoterapia.

O heme é o grupamento prostético da hemoglobina, e não apresentou qualquer efeito, no entanto, peptídeos gerados a partir da hidrólise da hemoglobina apresentam uma gama de efeitos no organismo de mamíferos, dentre eles a cascata de sinalização de proteína kinase C (Pkc) e caseína kinase 2 (Chen-Roetling et al, 2008). Os eritrócitos lisados e injetados intramuscularmente dessa forma estariam envolvidos na ação terapêutica da autohemoterapia. Temos que ter em mente também que um antígeno comum e não ativador como a hemoglobina pode ser subvertido a um imunoadjuvante, supressor ou modulador por estar sendo reconhecido fora de seu ambiente natural, o sangue. O grupo de evidências que descrevem as diferenças no reconhecimento de antígenos decorrentes ao ambiente e/ou o tipo celular através dos quais são apresentados às células efetoras criou a hipótese do “Danger Model” (Matzinger, 2002).

Por outro lado, não podemos nos abster em discutir um outro tipo celular potencialmente envolvido no efeito terapêutico visualizado na fração celular do sangue, as plaquetas. Um grande número de fatores de crescimento são produzidos e armazenados no interior dessas células, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um potente agente quimiotático, TGF- β (transforming growth factor- β) que possui atividade imunossupressora por evitar a ativação de linfócitos e macrófagos, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) também reconhecido imunomodulador por aumentar a viabilidade celular de fagócitos, dentre outros fatores de crescimento. De fato, autohemoterapia utilizando-se apenas da fração plaquetária já é utilizada em vários tipos de tratamento, de implantes

ósseos à cura de ulcerações cutâneas, associadas ou não à diabetes (O'Connell e cols. 2008; Sanchez e cols. 2007; Knighton e cols. 1990; Knighton e cols. 1986).

Como conclusão, observamos novas evidências a respeito da eficácia da autohemoterapia como ferramenta terapêutica imunomodulatória. Nossos resultados iniciais apontam para a participação preponderante da fração celular em detrimento da fração plasmática e do componente heme. Novos estudos tornam-se necessário para uma total compreensão do mecanismo de ação da supracitada ferramenta terapêutica.

Referências

Chen-Roetling J, Li Z, Regan RF (2008). Hemoglobin Neurotoxicity is Attenuated by Inhibitors of the Protein Kinase CK2 Independent of Heme Oxygenase Activity. *Curr Neurovasc Res.* 5, 193-8.

Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL (2002). Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood.* 99, 4160-4165.

Kikutani H, Makino S (1992). "The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains". *Adv. Immunol.* 51: 285–322.

Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler ELL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds: successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann surg* 1986; 204:322-30.

Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, non healing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170:56-60.

Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza AV, Bozza MT. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):24430-6.

MF, Oliveira PL, Graça-Souza AV, Bozza MT, Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2007 Jul 13;282(28):20221-9

Matzinger P (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296, 301-305.

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y (1980). "Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice". *Jikken Dobutsu* 29 (1): 1–13.

O'Connell S, Impeduglia T, Hessler K, Wang XJ, Carroll R, Dardik H. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Rep Reg* 2008; 16:749-756.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *The American Journal of Sports Medicine* 2007; 35 (2): 245-51.

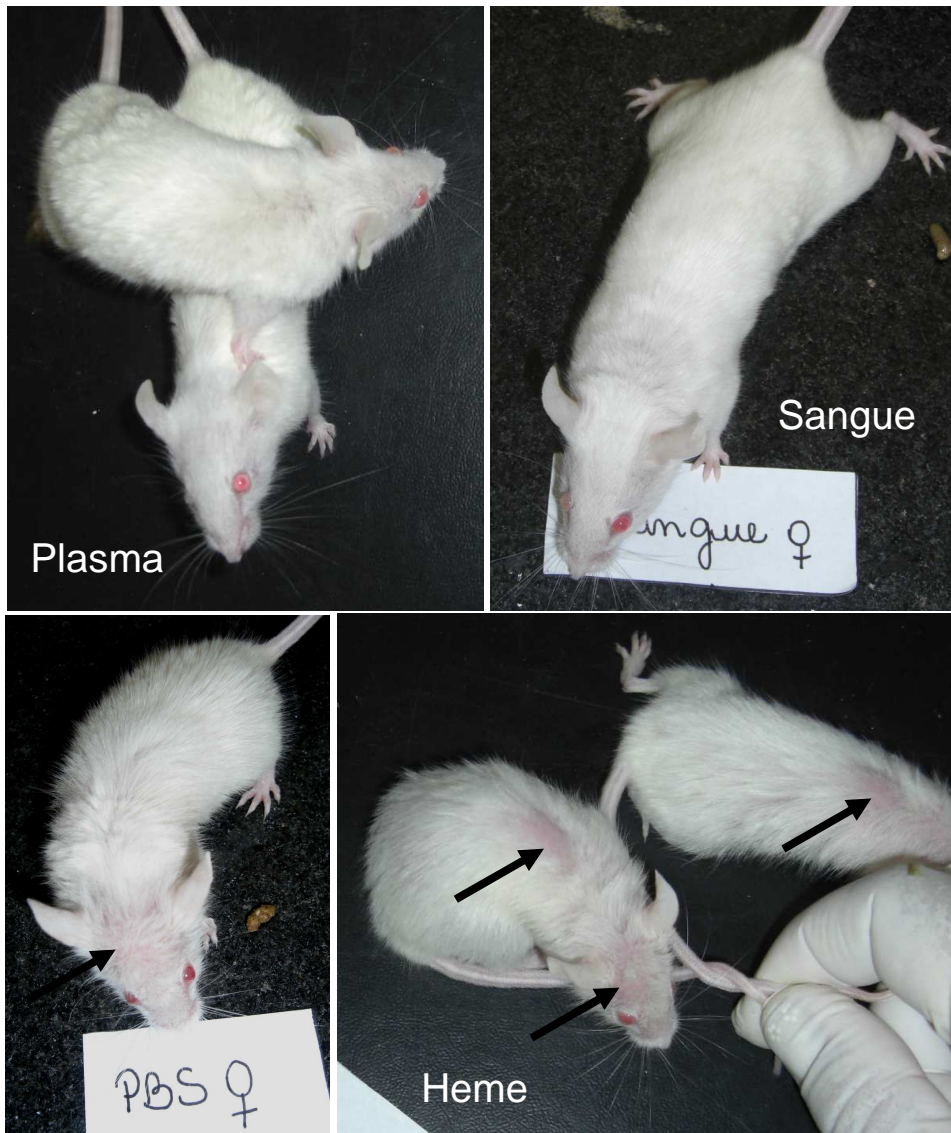


Figura 1- Visão dorsal de fêmeas de camundongos NOD de 6 meses de idade com 4 meses de tratamento envolvendo injeções intramusculares contendo diferentes estímulos.

Animais enquadrados no grupo de tratamento envolvendo administração de plasma e sangue apresentam aparência dorsal saudável, no entanto animais do grupo tratado com plasma apresentam leve arrepiamento de pelo, indicativo de desconforto. O mesmo não é visto no grupo tratado com a fração celular do sangue. Animais tratados com PBS (salina tamponada) e heme (Fe-Protoporfirina IX) apresentam claro sinal de dermatite, com perda de pelo (setas) e visível arrepiamento de pelo.



Figura 2- Visão ventral de fêmeas de camundongos NOD de 6 meses de idade com 4 meses de tratamento envolvendo injeções intramusculares contendo diferentes estímulos.

A visão ventral torna evidente a diferença de eficácia entre o tratamento usando a fração celular do sangue, e o tratamento envolvendo a fração plasmática. Enquanto os primeiros apresentam ausência total de dermatite, animais tratados com a fração plasmática do sangue apresentam níveis de inflamação semelhantes ao grupo que recebeu heme e o grupo controle (PBS). Setas apontam regiões onde há perda de pêlo decorrente de dermatite autoimune.