

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Avaliação do magnésio na capacidade imunomodulatória de
células tronco mesenquimais e sua ação sobre células
hematopoiéticas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***

Fabiana da Silva Lima

Tese para a obtenção do título de

DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

SÃO PAULO
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Avaliação do magnésio na capacidade imunomodulatória de
células tronco mesenquimais e sua ação sobre células
hematopoiéticas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***

FABIANA DA SILVA LIMA

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para a obtenção do título de
DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

SÃO PAULO
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L732a	Lima, Fabiana da Silva Avaliação do magnésio na capacidade imunomodulatória de células tronco mesenquimais e sua ação sobre células hematopoiéticas em modelos experimentais in vitro e in vivo / Fabiana da Silva Lima. - São Paulo, 2020. 102 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio
	1. Magnésio. 2. células imunes. 3. imunorregulação. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

Fabiana da Silva Lima

Avaliação do magnésio na capacidade imunomodulatória de células tronco mesenquimais e sua ação sobre células hematopoiéticas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*

Comissão Julgadora da tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof. Dr. Ricardo Ambrosio Fock
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra
(1º Examinador)

Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci
(2º Examinador)

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
(3º Examinador)

São Paulo, 08 de Maio de 2020.

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai Cicero.

Ao meu amado marido Moises, amigo e companheiro, sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, meu inestimável agradecimento pela oportunidade, orientação e dedicação durante essa jornada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, especialmente aos colegas de trabalho do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e da Administração (13A).

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e a Profa. Dra. Célia Colli, pela oportunidade para a realização de parte desse trabalho no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Christian Hoffmann pela oportunidade, confiança e amizade.

A equipe do biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química.

Aos colegas de pós-graduação do laboratório de Nutrição- Ferro pela colaboração.

Ao Edson Makiyama pela colaboração, apoio, incentivo e amizade durante todos esses anos.

A todos os amigos da Pós-Graduação, alunos da Iniciação Científica, e a todos os amigos do LNMM pelo companheirismo.

A FAPESP, pelo suporte financeiro.

A Ciência é importante para o desenvolvimento de um país.

RESUMO

LIMA, F. S. Avaliação do magnésio na capacidade imunomodulatória de células tronco mesenquimais e sua ação sobre células hematopoiéticas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2020, 102p.

O magnésio (Mg^{2+}) é um mineral que apresenta potencial anti-inflamatório, e dados da literatura mostram que o consumo adequado ou o enriquecimento de dietas com esse mineral pode ser benéfico para o sistema imunológico. Por outro lado, a deficiência de Mg^{2+} no organismo pode contribuir para alterações no sistema imunológico e para a formação de processo e mediadores inflamatórios, com capacidade de influenciar a complexa regulação tanto da hemopoese quanto dos mecanismos envolvidos no processo imunológico/inflamatório. Sabendo-se que o Mg^{2+} é indispensável para diversas funções celulares, o presente trabalho buscou investigar os efeitos *in vitro* do enriquecimento com Mg^{2+} sobre alguns mecanismos da capacidade imunomodulatória das CTMs e também as repercussões da hipomagnesemia sobre a medula óssea e sangue periférico em camundongos. Foram utilizadas células C3H/10T1/2, cultivadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} , células RAW 264.7 e também linfócitos primários de camundongos C57Bl/6 cultivados com “meios condicionados”. Os resultados mostraram aumento significativo da proliferação de células C3H/10T1/2 cultivadas em meio enriquecidos com Mg^{2+} , diminuição da produção de citocinas inflamatórias e diminuição da fosforilação de NF- κ B. A análise do efeito desse tratamento sobre outras células imunes resultou em modificação da produção de citocinas pelos linfócitos e células RAW 264.7, agindo sinergicamente com as moléculas produzidas pela célula C3H/10T1/2 potencializando o efeito imunossupressor. Para a investigação dos efeitos da deficiência de Mg^{2+} sobre as células da medula óssea e sangue periférico, foram utilizados camundongos C57BL/6, machos e adultos, dividido em 2 grupos, controle (dieta AIN93M) e deficiente em Mg^{2+} (AIN93M com 90% de restrição de Mg^{2+}) por 4 semanas. Os resultados mostraram que a deficiência dietética de Mg^{2+} resultou em aumento de neutrófilos no sangue periférico e de células jovens na medula óssea, e também alteração no ciclo celular e aumento da expressão de genes e proteínas relacionados à diferenciação de granulócitos.

Palavras-chave: mineral; anti-inflamatório; células imune; medula óssea; citocinas.

ABSTRACT

LIMA, F. S. Evaluation of magnesium in the immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells and its effects on the hematopoietic cells in experimental models *in vitro* and *in vivo*. Thesis [Doctorate in Food Science]. São Paulo: University of São Paulo, 2020, 102p.

Recent research works have shown that magnesium (Mg^{2+}) has anti-inflammatory potential, and that adequate intake or enrichment of diets with this mineral may have a beneficial role on the immune system. On the other hand, the low-magnesium diet may contribute to changes in the immune system and to the development of inflammatory mediators and processes, with capacity to influence the complex regulation of the hemopoiesis and as well as the mechanisms involved in the immunological/inflammatory response. Knowing that Mg^{2+} is indispensable for several cellular functions, this work aims to investigate the effects of culture medium enrichment with magnesium on some mechanisms of the immunomodulatory capacity of MSCs and also the repercussion, in mice model, of the magnesium deficiency on bone marrow and peripheral blood cells. C3H/10T1/2 cells were grown with different concentrations of Mg^{2+} , and both cells RAW 264.7 and primary lymphocytes from C57Bl/6 mice were cultivated using "conditioned media". The results demonstrated that C3H/10T1/2 cells cultivated in medium supplemented with Mg^{2+} showed a significant increase in the proliferation, decreased production of inflammatory cytokines, in addition to decreasing phosphorylation of $NF\kappa B$. Subsequently, the analysis of this treatment effect on the other immune system cells using "conditioned media" led to a modification of the production of some cytokines by lymphocytes and RAW 264.7 cells, acting synergistically with the molecules produced by the C3H/10T1/2 cell, boosting its effect immunosuppressant. To investigate the effects of Mg^{2+} deficiency on bone marrow cells and peripheral blood, C57BL/6 mice, males, adults, divided into 2 groups, fed AIN93M or AIN93M with 90% Mg^{2+} restriction for 4 weeks. We observed that dietary Mg^{2+} deficiency resulted in increased peripheral blood neutrophils and bone marrow immature cells, as well as increased gene and protein expressions related to granulocyte differentiation and cell cycle changes in hematopoietic cells.

Keywords: mineral; anti-inflammatory; immune cells; bone marrow; cytokines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de Mg ²⁺ em adultos humanos	21
Tabela 2. Interação da Célula Tronco Mesenquimal com as células imunes	31
Tabela 3. Concentração de Mg ²⁺ extracelular antes e após cultivo de 24 h.....	52
Tabela 4. Avaliação dos parâmetros séricos e do sangue periférico dos animais controles e deficientes em Mg ²⁺	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentração intracelular de Mg^{2+} ..	52
Gráfico 2. Análise da viabilidade das células C3H10T1/2 por MTT, cultivadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} ..	54
Gráfico 3. Avaliação da viabilidade relativa (A), apoptose (B) e necrose (C) das células C3H/10T1/2 por citometria de fluxo.....	55
Gráfico 4. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo nas células C3H/10T1/2 sem estímulo (A), estimuladas com LPS (B) e TNF- α (C).....	56
Gráfico 5 . Determinação de IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e PGE ₂ no sobrenadante das células C3H/10T1/2 após cultura de 24 h com diferentes concentrações de Mg^{2+} , sem estímulo ou desafiadas com LPS ou TNF- α por 2 h.	57
Gráfico 6. Produção de óxido nítrico nas células C3H10T1/2 cultivadas com 0, 1, 3 e 5 mM Mg^{2+} por 24 h sem estímulo ou estimuladas por 2 h com LPS ou TNF- α ..	58
Gráfico 7. Expressão e quantificação de (A) pNF κ B/NF κ B e (B) pSTAT3/STAT3 nas células C3H/10T1/2 tratadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} e estimuladas ou não com LPS e TNF- α	59
Gráfico 8 . Avaliação da viabilidade celular por MTT nas células RAW 264.7 (A) e linfócitos (B) cultivados com 'meios condicionados' por 24 h.....	60
Gráfico 9. Determinação de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α e IL-10 no sobrenadante das células RAW 265.7 após cultura por 24 h com meios controles e 'condicionados', desafiadas com LPS ou TNF- α	61
Gráfico 10. Determinação de IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) no sobrenadante de linfócitos após cultura por 24 h com meios controles e 'condicionados', desafiadas com LPS ou TNF- α	63
Gráfico 11. Peso corporal dos animais (A), consumo de ração (B) e água (C) dos grupos controle e deficiente em Mg^{2+} por 4 semanas.	64
Gráfico 12. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo nas células totais da medula óssea dos animais do grupo controle e deficiente em Mg^{2+}	66
Gráfico 13. Contagem total das células da medula óssea e mielograma dos camundongos submetidos à dieta controle e deficiente em Mg^{2+} por 4 semanas	67

Gráfico 14. Imunofenotipagem das células da medula óssea dos camundongos submetidos à dieta controle e deficiente em Mg^{2+} por 4 semanas.	68
Gráfico 15. Expressão de genes relacionados à diferenciação e proliferação nas células da medula óssea de animais dos grupos controle e deficiente em Mg^{2+}	70
Gráfico 16. Expressão e quantificação de (A) pSTAT3/STAT3 e (B) PCNA nas células da medula óssea de animais controle e deficiente em Mg^{2+}	71
Gráfico 17. Determinação de G-CSF (A) e IL-6 (B) no lavado da medula óssea de animais do grupo controle e deficiente em Mg^{2+}	72
Gráfico 18. Avaliação da formação de CFU-G nas células da medula óssea do grupo controle e deficiente em Mg^{2+} em meios de cultura controle e sem Mg^{2+} em ensaio de metilcelulose.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
CD	Grupos de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CFU-f	Unidade formadora de colônia fibroblastóide
CLP	Progenitor linfoide comum
CMP	Progenitor mielóide comum
COL-1	Colagenase 1
CTM	Célula tronco mesenquimal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator crescimento de fibroblasto
GMP	Progenitor granulócitos / macrófagos
IFN γ	Intérferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
ISCT	Sociedade Internacional de terapia celular
IT-HSC	<i>Intermediate-term hematopoietic stem cell</i>
LMPP	Progenitor multipotente iniciador linfóide
LPS	Lipopolissacarídeo
LT-HSC	<i>Long-term hematopoietic stem cell</i>
MagT1	Transportador de magnésio 1
MEP	Progenitor eritróide / megacariócito
Mg ²⁺	Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MPP	Progenitor multipotente
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
pNF κ B	Fator Nuclear Kappa B fosforilado

NMDA	N-metil D-aspartato
PCR	Proteína C Reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGE2	Prostaglandina E2
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
sICAM-1	Molécula de adesão intercelular solúvel -1
SLC41A1	<i>Solute Carrier Family 41 Member 1</i>
ST-HSC	Short -term hematopoietic stem cell
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
pSTAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription phosphorylated</i>
sVCAM-1	Molécula de adesão celular vascular solúvel -1
TGFβ	Fator de Transformação do crescimento beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
TLR3	Receptor <i>Toll-like</i> 3
TLR4	Receptor <i>Toll-like</i> 4
TNFα	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Cation</i>
TRPM	<i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
TRPM7	<i>Transient Receptor Potential Melastatin -7</i>
TRPV	<i>Transient Receptor Potential V</i>
XMEN	<i>X-linked immunodeficiency with magnesium defect, Epstein-Barr virus infection, and neoplasia</i>

Sumário	
1.INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Magnésio.....	20
2.1.2 Histórico e estrutura.....	20
2.1.3 Compartimentalização e metabolismo.....	20
2.1.2 Métodos laboratoriais para avaliação de Mg ²⁺	22
2.1.3 Canais transportadores de Mg ²⁺	23
2.1.4 Mg ²⁺ e sistema imune	25
2.2 Célula Tronco Mesenquimal (CTM) e Mg ²⁺	28
2.2.1 Aspectos históricos e descrição geral da CTM.....	28
2.2.2 Capacidade imunomoduladora da Célula Tronco Mesenquimal (CTM).....	29
2.2.3 Mg ²⁺ e Célula Tronco Mesenquimal (CTM).....	33
2.3 Hematopoese	35
2.3.1 Aspectos gerais	35
2.3.2 Magnésio e hemopoese	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Linhagem celular	41
4.1.1 C3H/10T1/2 clone 8 (ATCC® CCL-226™)	41
4.1.2 Condições de cultura	41
4.1.3 Suplementação dos cultivos com Mg ²⁺ e geração dos ‘meios condicionados’	41
4.1.4 RAW 264.7	42
4.1.5 Cultivo da RAW 264.7 com ‘meios condicionados’	42

4.2 Avaliação do ciclo celular em células C3H/10T1/2 por citometria de fluxo	42
4.3 Análise da apoptose e necrose por citometria de fluxo	43
4.4 Análise da proliferação relativa por MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio)	44
4.6 Imunofluorescência	44
4.7 Análise do Mg ²⁺ no meio de cultura e intracelular	45
4.8 Animais	45
4.8.1 Delineamento Experimental.....	45
4.9 Obtenção de sangue total e soro	46
4.10 Hemograma	46
4.11 Obtenção de células da medula óssea e mielograma.....	46
4.12 Imunofenotipagem para quantificação de células	46
4.14 Determinação da expressão de NFκB (total e fosforilado), STAT3 (total e fosforilado) e PCNA por Western Blot	47
4.14.1 SDS-PAGE e Western blot	47
4.14.2 Preparo do gel de poliacrilamida	47
4.14.3 Preparo do lisado de proteínas para SDS-PAGE e Western blot .	48
4.14.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana nitrocelulose	48
4.14.5 Sondagem das proteínas com anticorpos	49
4.14.6 Revelação com sistema quimioluminescente	49
4.15 Determinação de citocinas por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	49
4.16 Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real.....	49
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6. RESULTADOS	52
6.1.2 Determinação da concentração intracelular de Mg ²⁺ nas células C3H/10T1/2 após 24 h de cultivo	52

6.2 Expressão do canal TRPM7 nas células C3H/10T1/2.....	53
6.2 Análise da viabilidade de células C3H/10T1/2 cultivadas com diferentes concentrações de Mg ²⁺ por MTT	54
6.3 Análise da viabilidade, apoptose e necrose nas células C3H/10T1/2 cultivadas com diferentes concentrações de Mg ²⁺ por citometria de fluxo	55
6.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	55
6.5 Avaliação da produção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β no sobrenadante das células C3H/10T1/2 tratadas com diferentes concentrações de Mg ²⁺ e estimuladas com LPS ou TNF- α	56
6.8 Análise da produção de óxido nítrico nas células C3H10T1/2	58
6.6 Avaliação da expressão de p NF κ B / NF κ B e pSTAT3/STAT3.....	58
6.9 Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 e em linfócitos por MTT cultivadas com 'meio condicionado' por 24 h.....	60
6.10 Determinação de IL-1 β e IL-6 e nas células RAW 265.7 cultivadas com 'meio condicionado'.	60
6.11 Análise do peso, consumo de ração e água	64
6.12 Análise do perfil bioquímico, inflamatório e hematológico	64
6.13 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	66
6.13 Contagem das células da medula óssea e mielograma	66
6.15 Avaliação da expressão gênica nas células da medula óssea.....	70
6.16 Avaliação da expressão de pSTAT3/STAT3 e PCNA	71
6.17 Determinação da concentração de G-CSF e IL-6	71
6.18 Análise de unidade formadora de colônia	72
7. DISCUSSÃO	73
8. CONCLUSÃO.....	86
ANEXO 1. CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	101
APÊNDICE 1. TRABALHOS DECORRENTES.....	102

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que o estado nutricional de um indivíduo pode influenciar direta e indiretamente o sistema imune. Diversos estudos têm discutido amplamente a relação entre a composição da dieta e suas repercussões na medula óssea, em órgãos linfoides e na microbiota intestinal (CORTEZ et al., 2012; MELLO, 2014; SUEZ, 2014). Assim, esforços para esclarecer a relação entre os componentes da dieta e seu impacto no sistema imune têm sido realizados, bem como estudos com macro e micronutrientes de forma isolada, demonstrando como o consumo de dietas desbalanceadas, ocasionada tanto pela escassez quanto pelo excesso na ingestão de alimentos, pode prejudicar o sistema imune e alterar os mecanismos de defesa do organismo (De Rosa et al. 2015).

O magnésio é o segundo mineral mais abundante no meio intracelular e o quarto mais abundante no organismo, e está envolvido em centenas de reações enzimáticas, além de estar relacionado com a síntese de DNA, RNA e de proteínas, sendo fator importante no controle da proliferação celular (ROMANI, 2011; BAAIJ et al., 2015). Porém, o consumo desse mineral tem diminuído nas últimas décadas, e pesquisadores tem observado que sua deficiência e/ou inadequação está relacionado com inflamação (ALTURA,1991). Grande parte das doenças crônicas, tais como aterosclerose, diabetes e síndrome metabólica, cursam com inflamação. Nesse contexto, tem-se discutido se a deficiência e/ou a inadequação dietética de magnésio pode constituir fator de risco e contribuir para o desenvolvimento dessas doenças (ALTURA, 2014).

Se por um lado a deficiência e/ou inadequação dietética de magnésio leva a inflamação, por outro o consumo adequado ou o enriquecimento de dietas com esse mineral tem sido apontado como benéfico, e o potencial anti-inflamatório desse mineral tem sido amplamente estudado (ROCHELSON et al., 2007; SU et al., 2013; LEE et al., 2015). A adição de magnésio na dieta em forma de suplemento é geralmente segura, mas deve ser cuidadosamente observada, porque embora em indivíduos saudáveis a hipermagnesemia seja rara, ela pode ocorrer naqueles com função renal prejudicada, através da utilização de fármacos que contém magnésio ou em situação onde a suplementação intravenosa não é rigorosamente controlada (IOM, 1997).

Em relação ao sistema imune, pesquisas tem observado que perturbações na homeostase de magnésio levam a diversas alterações em células e moléculas envolvidas com a resposta imunológica (ORDEN et al, 2006; MAZUR et al., 2007; LIBAKO et al, 2015). De fato, sabe-se da importância do magnésio para os linfócitos e como exemplo, Chaigne-Delalande & Lenardo (2014) comentam em seu artigo de revisão sobre a sinalização desse cátion divalente nas células imunes, que dos 22 canais de magnésio descritos na literatura, 16 são expressos em células T, mas conclui que há muito a ser esclarecido sobre o papel desses canais no contexto imunológico.

Além das células imunes no sangue periférico e tecidos, a célula mesenquimal tem reconhecidamente papel imunomodulatório e imunossupressor (além da sua propriedade tronco/progenitora), com participação na regulação das células da imunidade inata e adaptativa (DAZZI et al., 2012; BERNARDO & FIBBE, 2013; WANG et al, 2014).

A propriedade imunomodulatória da célula tronco mesenquimal depende de vários fatores, bem como da presença de diversos receptores presentes nessas células. A revisão elaborada por Gebler et al. (2012), cita alguns desses fatores, que incluem a expressão de receptores que podem estar envolvidos no processo de migração celular, além da secreção de moléculas como fatores de crescimento e citocinas, quimiocinas e hormônios, que podem exercer efeitos nas células imunes, mudando o perfil da produção de citocinas por essas células.

Muitos estudos mostram a íntima relação entre magnésio e células mesenquimais no campo da implantologia. Isso se deve as inúmeras propriedades do magnésio relacionadas à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, e da capacidade da célula tronco mesenquimal em se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (CIPRIANO et al., 2015; WU et al., 2015; LUTHRINGER et al., 2016; FAZLIAH et al., 2016).

Embora seja muito discutida a interação entre ligas de magnésio e células mesenquimais, pouco se sabe da influência do magnésio sobre a capacidade da célula mesenquimal em regular outras células do sistema imunológico. Além disso, pouco se sabe sobre o impacto da deficiência de Mg^{2+} sobre a hematopoese – processo complexo de formação, desenvolvimento e proliferação de diversos tipos celulares, incluindo as células que compõem o sistema imune. Sendo assim, nosso

trabalho busca investigar a interação entre esse mineral e as células mesenquimais e também sobre a hematopoese.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Magnésio

2.1.2 Histórico e estrutura

O nome magnésio é derivado do grego de Magnésia, uma região do leste da Tessália, na Grécia. Descrições sobre o sal de Epsom (sulfato de magnésio) e magnésia alba (carbonato de magnésio), datam por volta do ano de 1700. Friedrich Hoffmann publicou em 1722, uma série de observações físicas e químicas a respeito do sal de Epsom e magnésia alba (MULTHAUF, 1975). Em 1754, o químico e físico escocês Joseph Black iniciou sua pesquisa com magnésia alba que deu origem a sua tese em Edimburgo, que incluiu a descoberta de dióxido de carbono (que ele chamou de 'ar fixo'), primeiras medidas gravimétricas sobre as mudanças causadas quando se aquecia magnésia alba (liberação de CO₂) e reagindo os produtos com ácidos ou álcalis. Isso serviu de base para a química moderna, e foi quando o magnésio teve reconhecimento como um elemento químico. Como sua tese lhe daria o grau de médico, Black incluiu em sua pesquisa uma seção com magnésia alba e seu efeito como antiácido e laxante (MULTHAUF, 1975; COOPER, 1999).

O magnésio é o oitavo elemento mais abundante na crosta continental da terra (na crosta: peso 2,3 %; molar 2 %, volume 0,3%), todos como Mg²⁺ em minerais e na água do mar (YANAGI, 2011). A maior fonte de Mg²⁺ biologicamente disponível na terra é em oceanos e rios. É um metal alcalino terroso, número atômico 12, massa atômica 24,305 daltons e sólido a 20°C (RSC, 2016).

2.1.3 Compartimentalização e metabolismo

O magnésio é quarto cátion mais abundante no corpo e o segundo em maior concentração no compartimento intracelular. É cofator de centenas de enzimas e está envolvido em vários processos metabólicos e bioquímicos dentro da célula (BAIJJ et al., 2015).

O corpo humano adulto contém aproximadamente 24 g de magnésio (Mg²⁺) (1mol), sendo que cerca da metade encontra-se no osso e o restante distribuído nos tecidos moles (Tabela 1). A média da concentração sérica desse mineral é 0,85

mmol / L, com um intervalo de referência entre 0,7 – 1,0 mmol / L (ELIN, 1987), o qual é dividido em ionizado (55 – 70 %), ligado à proteína (20 – 30 %) ou complexado com ânions, tais como fosfato, bicarbonato, sulfato ou citrato (5 – 15 %) (GROBER et al., 2015).

Tabela 1. Distribuição de Mg²⁺ em adultos humanos

Tecido	Massa corpórea	Concentração de Mg²⁺ (mmol / Kg)
Soro	3.0	0.85
Eritrócito	2.0	2.5
Tecidos moles	22.7	8.5
Músculo	30.0	9.0
Osso	12.3	43.2
Total	70	

Fonte: **Clinical Chemistry**, vol.33, n.11 (1965-1970), 1987.

A homeostase de Mg²⁺ é mantida pelo intestino, rins e osso. A absorção intestinal de Mg²⁺ é dependente de seu *status* no organismo e não proporcional a ingestão do mineral. O intestino excreta cerca de 40 mg de magnésio por dia e cerca de 20 mg é absorvido no intestino grosso. A absorção é mediada por transporte passivo paracelular, responsável por 80 - 90 % da absorção de Mg²⁺ intestinal e por transporte transcelular ativo. Esses mecanismos foram muito bem descritos na pesquisa apresentada por Fine et al. em 1991. Quanto menor a concentração do mineral no organismo, maior a absorção relativa e vice-versa. Os rins são fundamentais para a homeostase de Mg²⁺, sendo a concentração sérica do mineral controlada pela excreção na urina (NARDERI & REILLY, 2008; GROBER et al., 2015). Em condições fisiológicas, aproximadamente 2400 mg de magnésio plasmático são filtrados pelos glomérulos e desses, cerca de 95% são imediatamente reabsorvidos, e apenas 3 a 5% são excretados na urina (JAHNEN-DECHENT & KETTELER, 2012; AHMED & MOHAMMED, 2019).

Alguns hormônios podem influenciar a absorção e excreção de magnésio, como 2,5-diidroxi-vitamina D (1,25(OH)₂ D) que estimula a absorção intestinal de Mg²⁺, sendo que a deficiência desse mineral pode prejudicar a resposta do hormônio da paratireoide (PTH). Esse hormônio tem o potencial de aumentar a reabsorção de Mg²⁺ no rim, a absorção no intestino e a liberação desse mineral do osso

(GROEBER et al., 2015). Parte do Mg^{2+} do osso está presente na superfície óssea e funciona como um tampão para manter a concentração extracelular do mineral constante. Quando há redução da concentração plasmática de Mg^{2+} , pode haver rápida liberação do Mg^{2+} ligado à superfície do osso para o compartimento sanguíneo (ELIN, 1993).

A deficiência de magnésio é classificada em primária e secundária. A primeira está relacionada com baixa ingestão, redução na absorção intestinal, aumento na excreção urinária, alteração na deposição/mobilização ósseas e hiperadrenocorticismos. A segunda está relacionada com diversas condições patológicas, tais como diabetes tipo 2, alcoolismo e doenças que prejudiquem a absorção intestinal (como a doença inflamatória intestinal e a doença celíaca), ou ainda consequência de determinadas terapias medicamentosas como, por exemplo, utilização de diuréticos depletos de magnésio (BELIN & HE, 2007, ELISAF et al, 1995). A deficiência de Mg^{2+} pode atingir pacientes hospitalizados, principalmente idosos e indivíduos internados em unidade de terapia intensiva (UTI) o que pode aumentar o tempo de internação e piorar o prognóstico do indivíduo (TONG & RUDE, 2005).

2.1.2 Métodos laboratoriais para avaliação de Mg^{2+}

O crescente interesse da pesquisa na elucidação dos processos pelos quais o Mg^{2+} participa no organismo humano levou ao desenvolvimento de metodologias para detectar e medir variações na concentração de Mg^{2+} tanto extra como intracelular. A partir de então, a relação entre essas variações com a homeostase do mineral e com patologias específicas puderam ser identificadas (ROMANI, 2011).

Elin (1987) em seu artigo de revisão deixa claro que embora o magnésio participe como cofator em centenas de reações enzimáticas, e seu papel seja primordialmente intracelular, a maioria dos estudos sobre esse mineral parte de fontes de amostra extracelular, como a análise da concentração sérica. Trinta anos depois da publicação desse trabalho, a análise sérica desse mineral ainda é a mais utilizada rotineiramente no âmbito clínico-laboratorial.

O compartimento sérico representa apenas 1% do conteúdo total de Mg^{2+} corporal e não reflete o conteúdo desse mineral no organismo. Dessa forma, pode

existir dificuldade na observação da inadequação da concentração de Mg^{2+} naqueles compartimentos onde esse mineral é essencial. Portanto, a incorporação de outros métodos laboratoriais que reflitam o estoque corpóreo de Mg^{2+} ainda é um desafio a ser superado (WITKOWSKI et al., 2011).

Resultados de determinações da concentração de Mg^{2+} sérico abaixo dos valores de referência (adultos: 0,66 – 1,07 mmol / L) (ACB, 2012) ocorre apenas na deficiência grave, condição relativamente incomum na população. Porém a existência da diminuição da concentração de Mg^{2+} em outros tecidos pode existir sem que haja prejuízos ao compartimento sérico (ARNAUD, 2008). Para citar um exemplo, Sales et al. (2014) em estudo experimental com animais, observaram que a restrição dietética de magnésio de 70% associada ao aumento do consumo de lipídios resultou em redução da excreção urinária de Mg^{2+} e diminuição de Mg^{2+} ósseo, sem alterações nos níveis plasmáticos do mineral. Ainda, um estudo com mulheres obesas que apresentavam diminuição da ingestão dietética de Mg^{2+} exibiram menor excreção urinária desse mineral, porém as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de Mg^{2+} estavam dentro da faixa de referência (DE OLIVEIRA et al., 2015). Portanto, detectar a prevalência da deficiência desse mineral na população constitui um desafio, e o impacto da inadequação dietética de Mg^{2+} pode ser subestimado (SUGIMOTO et al., 2012; BAAIJ et al., 2015).

A avaliação da concentração de Mg^{2+} em músculos e ossos, os principais compartimentos de estoque desse mineral, permite avaliar com segurança o *status* de Mg^{2+} no organismo, sendo muito utilizada em estudos experimentais. Porém, essa metodologia é invasiva e inviável na rotina clínico-laboratorial. Outro método laboratorial inclui a determinação de magnésio intracelular (leucocitário e eritrocitário), urinário e o fecal, e o teste de sobrecarga de Mg^{2+} que poderiam ser adaptados ao laboratório de análises clínicas (SALES et al., 2012). A recomendação do teste de sobrecarga desse mineral é limitada, pois esse é um teste que deve ser realizado apenas em ambiente hospitalar.

2.1.3 Canais transportadores de Mg^{2+}

A literatura tem apontado a descoberta de vários canais transportadores de Mg^{2+} nos últimos anos, e muitos desses canais são críticos para a homeostase intracelular desse mineral. Dentre esses canais, SLC41A1 e 2, MagT1 e TRPM7 são

de alta relevância para a o controle intracelular de Mg^{2+} e estão relacionados com a imunidade (CHAIGNE-DELANDE et al., 2014; 2013; BAIJ, 2015). TRPM6 também é crucial para a homeostase desse mineral, já que está relacionado com os mecanismos de absorção intestinal e excreção renal de Mg^{2+} (VOETS et al., 2004).

A superfamília de canais de íons TRP nos vertebrados é classificada em três subgrupos: TRPC, TRPV e TRPM. Durante os últimos anos, muitos esforços têm sido feitos para caracterizar molecular e funcionalmente o subgrupo TRP, de genes que codificam TRPM (melastatin-related transiente receptor potential). Esse subgrupo é dividido em quatro pares de canais homólogos (TRPM1 e 3; TRPM2 e 8; TRPM 4 e 5; TRPM6 e 7) (FLEIG & PENNER, 2004).

Os canais iônicos TRP são expressos em diversos tipos celulares e estão localizados na membrana plasmática. A ativação dos canais pode ocorrer por diferentes tipos de estímulos, e uma vez que ocorre a ativação do canal, a membrana celular despolariza e permite o fluxo transmembrana de minerais tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , assim como a ativação de vias associadas a esses eventos. Em resumo, essa é a base de funcionamento dos canais TRP, que através da regulação da concentração intracelular de cátions associadas a vias de sinalização, são capazes de modular, por exemplo, processos como crescimento, sobrevivência, diferenciação e migração celular (YEE et al. 2014; NALDONI & ZIERLER 2018). O canal TRPM7 possui um importante papel na homeostase intracelular do Mg^{2+} , mas também em menor proporção de Ca^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} , enquanto o TRPM6 está relacionado com transporte epitelial do Mg^{2+} , e ambos atuam em cooperação no processo de absorção de Mg^{2+} (SCHMITZ et al., 2003; SONTIA et al., 2008; SCHLINGMANN et al., 2007; YEE et al., 2014).

Os canais TRPM6 e TRPM7 são diferentes de outros membros do subgrupo, pois contêm domínios de proteína quinase tipo α serina/treonina dentro das suas seqüências C-terminais. Portanto, o TRPM7 não é apenas um canal, mas faz parte de uma família de proteínas quinases conhecidas como α -quinases, e pode autofosforilar em serina e treonina (FUJIWARA & MINOR, 2008).

Dada a importância do canal TRPM7 em diversos tipos celulares, como citado anteriormente, Cheng et al. (2010) investigaram o canal TRPM7 nas células mesenquimais. Nesse trabalho foram utilizadas células mesenquimais isoladas da medula óssea de camundongos C57BL/6, submetidas a cultivo com meio para indução à diferenciação em osteoblastos. Foi utilizado RT-PCR (qPCR) para

quantificar níveis mRNA TRPM7 nas células mesenquimais com indução à osteogênese ou nas células mesenquimais knockdown para TRPM7, imunohistoquímica, ensaio de eletrofisiologia e viabilidade celular. Os autores verificaram: i) na análise de RT-PCR transcritos de TRPM7 e imunorreatividade à proteína nas células mesenquimais; ii) ativação do canal em resposta a depleção intracelular de Mg^{2+} ; iii) nas células knockdown, diminuição da sobrevivência e aumento da expressão de TRPM7 durante a osteogênese, o que pode indicar, em resumo, que esse canal possui papel no processo de diferenciação e sobrevivência dessas células. Também, XIAO et al. (2015; 2016) investigaram o papel do TRPM7 e seu envolvimento com o processo de mecanotransdução em células mesenquimais da medula óssea de humanos, e puderam identificar que esse canal está envolvido com a osteogênese. Esse mecanismo poderia ser explicado do seguinte modo: quando essa célula recebe um estímulo mecânico (como pressão) o canal TRPM7 se abre, aumentando o influxo de Ca^{2+} e ativação IP_3R_2 (receptor tipo 2 inositol trifosfato - retículo endoplasmático) que libera o Ca^{2+} intracelular amplificando a sinalização de NFATc1 e indução à osteogênese. Porém esse mecanismo ainda não está totalmente esclarecido.

2.1.4 Mg^{2+} e sistema imune

Devido à variedade de funções biológicas que o Mg^{2+} participa no organismo, muitas investigações têm sido realizadas com esse mineral no campo da imunologia.

Nas últimas décadas, uma série de estudos experimentais tem relacionado a deficiência de Mg^{2+} à inflamação (com aumento de citocinas inflamatórias em diversos tipos celulares), aumento do número e ativação de células como neutrófilos, macrófagos, endoteliais e acelerada involução do timo, o que poderia afetar a função imune desse órgão (ALCOCK et al., 1973; MALPUECH-BRUGÈRE, 1999; TAM et al., 2003). Ainda em relação ao timo, estudos experimentais (PETRAULT et al., 2002) observaram que a deficiência de Mg^{2+} , mesmo por um curto período de tempo, pode levar a mudanças na expressão dos genes envolvidos na proteção e reparo das células contra estresse oxidativo, antes mesmo da ocorrência de qualquer modificação na estrutura e função celular. Alterações genéticas que perturbem o metabolismo do Mg^{2+} também leva a alterações do sistema imune de

humanos. Aqui, a expressão dos canais de Mg^{2+} TRPM7 e MagT1 e sua regulação citosólica está fortemente relacionada com a homeostase celular, como citado anteriormente. MagT1 em humanos é um canal exclusivo para esse mineral, e é fortemente expresso nas células epiteliais e do sistema imune. Esse canal é um regulador basal da concentração intracelular de Mg^{2+} e a supressão da sua expressão leva a diminuição da captação de magnésio para células T e B e a perda da expressão de NKG2D, um receptor ativador de citotoxicidade em células CD8+ e NK (Natural Killer). Assim, mutação na expressão desse canal pode levar a uma síndrome denominada XMEN (X-linked immunodeficiency, Mg^{2+} defect, Epstein-Barr virus (EBV) infection and neoplasia) (LI et al., 2014; CHAIGNE-DELALANDE & LEONARDO, 2014). Além disso, Matsuda-Lennikov et al. (2019) observaram que alteração no canal MagT1 e a diminuição da concentração de Mg^{2+} intracelular pode prejudicar o processo de glicosilação de um subconjunto específico de N-glicoproteínas que podem afetar a função de células imune e contribuir para a síndrome XMEN.

A deficiência de Mg^{2+} também pode desencadear alterações no número de leucócitos no sangue periférico. MALPUECH-BRUGÈRE et al. (2000), avaliaram a deficiência de Mg^{2+} em ratos por curto período de tempo (8 dias), e verificaram aumento no número total de leucócitos, principalmente neutrófilos, e em menor proporção monócitos, basófilos e eosinófilos. Os autores também verificaram aumento na concentração de IL-6. Ainda nesse estudo, no compartimento intraperitoneal, foram encontradas duas vezes mais células mononucleadas no grupo de animais deficientes comparados ao grupo controle.

Além dos leucócitos, a deficiência de magnésio também pode levar a alterações nos eritrócitos, porém há poucos dados atuais na literatura. Alguns trabalhos experimentais observaram que a hipomagnesemia pode desencadear um quadro de anemia, seja por conta do aumento da destruição de eritrócitos (por alterações na membrana, por exemplo) ou pelo aumento do estresse oxidativo e inflamação que poderiam contribuir para esse quadro (PIOMELLI, S. et al., 1973; Elin, R. J. et al., 1980; SANCHEZ-MORITO, N. et al., 2000).

Alguns mecanismos têm sido propostos na tentativa de esclarecer a relação entre deficiência de magnésio e inflamação, sendo o aumento intracelular de Ca^{2+} ; com abertura dos canais e ativação de receptores NMDA (N-methyl-D-aspartate), liberação de neurotransmissores, tais como substância P, oxidação de membrana e

maior ativação da via do NFκB os principais fatores a serem considerados (MAZUR et al., 2007).

Em humanos, estudos clínicos sugerem que a diminuição do consumo de magnésio também pode estar associada à predisposição ao surgimento de processo inflamatório e estresse oxidativo. Nos Estados Unidos, dados do NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 – 2000), um programa de estudos com a finalidade de avaliar a saúde e o estado nutricional de adultos e crianças, apontaram que indivíduos adultos que consomem < 50 % da RDA (Recommended Dietary Allowances) para Mg^{2+} foram 1.48 a 1.75 vezes mais propensos a ter aumento na concentração sérica de PCR (Proteína C Reativa), do que adultos que consumiram quantidade acima ou igual à RDA (KING et al., 2005).

Se por um lado, estudos experimentais e em humanos tem observado como a deficiência e/ou inadequação dietética de Mg^{2+} pode levar a inflamação, nas últimas décadas pesquisas também têm verificado exatamente o oposto, ou seja, o efeito anti-inflamatório desse mineral.

Em 1991 nos EUA, foi criado o Women's Health Initiative Observational Study (WHI), com a finalidade de abordar as causas mais comuns de morte, deficiência e qualidade de vida em mulheres na pós-menopausa, com foco nas doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose. Com dados do estudo observacional (para identificar preditores de doenças), Chacko et al. (2010) avaliaram em mulheres de diferentes etnias com idade entre 50-79 anos, a associação entre ingestão dietética de magnésio e a concentração de biomarcadores da inflamação sistêmica (PCR, IL-6 e TNF), disfunção endotelial (sICAM-1 e sVCAM-1) e E-selectina. Os autores concluíram que o aumento na ingestão de magnésio estava associado com a diminuição da concentração destes biomarcadores inflamatórios e endoteliais.

O $MgSO_4$ (sulfato de magnésio) é amplamente usado como agente tocolítico (para agir na prevenção do parto prematuro), convulsão na pré-eclampsia e redução do desenvolvimento de paralisia cerebral. *In vitro*, Sugimoto et al. (2012) verificaram o papel imunomodulatório do magnésio em células mononucleares do sangue periférico materno de mulheres tratadas por indicação médica com $MgSO_4$ (6 mg/dL), e em células mononucleares do sangue do cordão umbilical. Os pesquisadores observaram diminuição da produção de TNF- α e IL-6, e redução da ativação de NFκB nas células mononucleares do sangue periférico. Verificaram, também *in vitro*, que células mononucleares expostas a $MgSO_4$ na concentração de

2.5 mM apresentaram redução na produção de citocinas inflamatórias após estímulo com diferentes ligantes de TLR, sugerindo que o magnésio possivelmente apresenta uma atividade anti-inflamatória de amplo espectro.

2.2 Célula Tronco Mensenquimal (CTM) e Mg²⁺

2.2.1 Aspectos históricos e descrição geral da CTM

Uma série de pesquisas realizadas por Friedenstein (1924-1998) entre a década de 60 e 70 apresentaram as primeiras descrições sobre uma população de células tronco não hematopoiéticas na medula óssea. Essas células apresentavam morfologia tipo fibroblastos, aderentes, formadoras de colônias (CFU-f), multipotentes, com alta capacidade de se multiplicar *in vitro* e não hematopoiéticas, importantes para o microambiente medular e capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Antes dele, Alexander Maximow (1874-1928) um pesquisador pioneiro na área de hematologia experimental, já havia conceituado a célula tronco hematopoiética e a hematopoese. Juntos, seus trabalhos formaram a base do desenvolvimento das pesquisas na área da hematologia experimental, do transplante de células e terapia celular (MAXIMOW, 1924; FRIEDENSTEIN et al., 1966; AFANASYEV et al., 2009).

A nomenclatura da CTM ainda é muito discutida podendo ser descrita como célula estromal da medula óssea, célula mesenquimal estromal multipotente e célula tronco esquelética (ABDALLAH & KASSEM, 2008), e mais recentemente, Caplan (2010; 2017) sugere o nome de MSC (Medicinal Signaling Cells), porque segundo o autor: “a função das MSCs *in vivo* é secretória e primariamente funcional em locais de lesão, doença ou inflamação[...]”.

Embora sejam divulgados diversos trabalhos na literatura com o nome ‘célula tronco mesenquimal’ (CTM) independente do tecido de origem isolado, a capacidade multipotencial dessa célula *in vitro* pode (de acordo com alguns pesquisadores) não estar correlacionada ao mesmo potencial *in vivo*, e apenas sua diferenciação *in vitro* nas três linhagens citadas acima, nem sempre pode significar multipotência (BIANCO et al., 2006; 2008). Por isso, na tentativa de resolver várias questões acerca da CTM, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the ISCT (International Society for Cellular Therapy)* (DOMINICI et al., 2006), propôs um

conjunto de definições, a fim de padronizar os critérios mínimos para caracterização dessas células, para uso em investigações tanto experimentais como em ensaios pré-clínicos que incluem três propriedades fundamentais: (i) a capacidade de aderência ao plástico em condições de cultivo padrão; (ii) marcação positiva ($\geq 95\%$) por citometria de fluxo para: CD13, CD29, CD44, CD54, CD105, CD73, CD90, CD166, Stro-1; e negativa ($\leq 2\%$ aceitável) para: CD45, CD31, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, HLA-DR (II); (iii) diferenciação *in vitro* em condições de cultivo padrão e respectiva coloração específica para as três linhagens: osteoblastos (alizarina red), adipócitos (oil red) e condrócitos (imunohistoquímica para colágeno II).

Além da medula óssea, a CTM pode ser isolada de diferentes tecidos, como citado anteriormente. Estes incluem o adiposo, cardíaco, cordão umbilical, epitélio intestinal, entre outros (KRAMPERA et al., 2006; SHI et al., 2012 BIANCO et al., 2008; 2011), e ainda apresentar potencial de diferenciação em diferentes linhagens além de osteoblastos, condrócitos e adipócitos, como apontado na literatura (KOPEN et al., 1999; WANG et al., 2016). Na medula óssea, a CTM é capaz de dar suporte e sustentação ao tecido hematopoético, já que células importantes para a homeostase do microambiente medular, como osteoblastos, diferenciam-se a partir dessa célula (TAICHMAN, 2005). Nesse contexto, alterações na CTM podem levar a perturbações em processos cruciais para a hematopoese, tais como sobrevivência e proliferação celular.

2.2.2 Capacidade imunomoduladora da Célula Tronco Mesenquimal (CTM)

Nos últimos anos, a literatura tem apontado crescente corpo de estudos clínicos e experimentais que tiveram por objetivo investigar a capacidade imunomoduladora da CTM (HOOGDUIJN, 2015; GAO et al., 2016; MA & CHAN, 2016). Embora a discussão sobre a capacidade imunológica dessa célula seja abrangente, os mecanismos pelos quais a CTM exerce seu potencial imunomodulatório não estão totalmente esclarecidos (GAO et al., 2016; WEISS & DAHLKE, 2019). As CTMs são capazes de secretar inúmeras citocinas e fatores de crescimento, e essas moléculas são capazes de modular diversos mecanismos biológicos tais como diferenciação, migração e apoptose (GEBLER et al., 2012). Além disso, nas últimas décadas, muitos trabalhos têm verificado o papel

imunossupressor dessa célula *in vivo* e *in vitro*, exercendo efeitos modulatórios e interagindo com diferentes células imunes, tais como linfócitos T, B, NK e células dendríticas (BARTOLOMEW et al., 2002; AGGARWAL & PITTENGER, 2005; GHANNAM et al., 2010; LI & HUA, 2017). Dessa forma, as CTMs são capazes de regular tanto a resposta imune inata quanto adaptativa, tanto pela interação (e ativação) com as células do sistema imune (Figura 1), mas também, por secretar citocinas e fatores de crescimento, tais como IL-6, IL-8, TGF β -1 e também IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase), HLA-G (antígeno leucocitário humano), e PGE2 (prostaglandina E2), que são capazes de modular a inflamação, e estão relacionados com os processos de tolerância imune (MA et al., 2016).

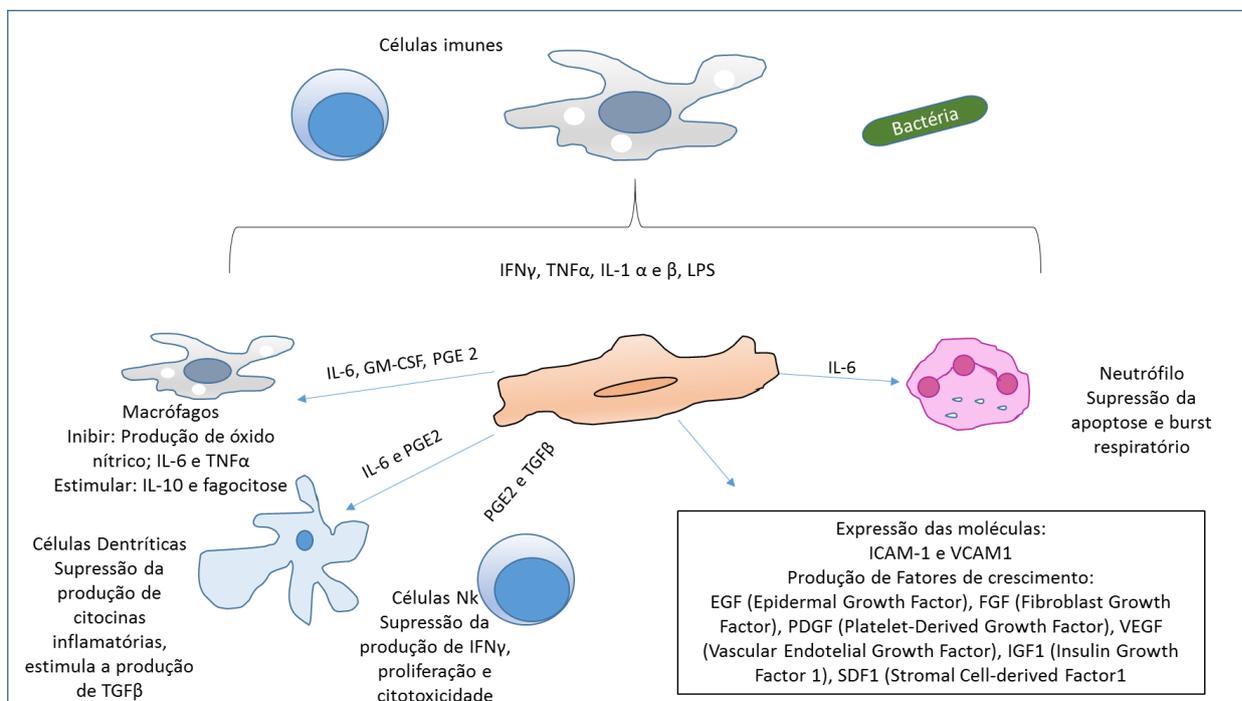


Figura 1. Célula tronco mesenquimal e sua interação com as células imunes após ativação com diferentes tipos de estímulos (**adaptado de:** GLEN et al., 2014)

A tabela 2 apresenta resumidamente alguns trabalhos que mostram a relação entre a secreção de moléculas pela CTM e seus efeitos em diferentes células do sistema imune. Por outro lado, alguns estudos também têm observado que a CTM pode apresentar potencial imunestimulatório, ao receber, por exemplo, um desafio via TLR3 e TLR4, que podem influenciar na adoção de um fenótipo anti ou pró-inflamatório (BERNARDO & FIBBE, 2013; GLENN & WHARTENBY, 2014).

Tabela 2. Interação da Célula Tronco Mesenquimal com as células imunes

Referência	Tipo celular	Resultado da interação
BARTOLOMEW et al. (2002)	Linfócitos T	Inibição da proliferação
GLENNIE et al. (2005)	Linfócitos T	Inibição da proliferação (aumento no número de células na fase G0/G1 do ciclo celular; Inibição da expressão de Ciclina D2 e aumento na expressão de p27 ^{kip1})
AGGARWAL & PITTENGER (2005)	Linfócitos Th1, Natural Killer Linfócitos Th2 Células Dendríticas Células mononucleares do sangue periférico	Diminuição da produção de IFN γ Aumento da produção de IL-4 Diminuição da produção de TNF α , aumento da produção de IL-10 Aumento de IL-6, IL-8 e PGE2.
CHEN et al. (2008)	Monócitos e Queratinócitos Macrófagos Células endoteliais	Aumento na migração Aumento do número de células infiltradas Efeitos quimioatraentes e mitogênico (aumento de células CD34, cKit ou Flk1; marcadores endoteliais+)
LUZ-CRAWFORD et al. (2013)	Células T CD4+	Supressão da proliferação, ativação e diferenciação (Th1 e Th17)
KWON et al. (2014)	Células Treg / Linfócito T total Células mononucleares do sangue periférico	Aumento da razão; aumento da expressão FoxP3 mRNA (marcador identificação Treg) Aumento de IFN γ , IL-4 e TGF β mRNA
DAVIES et al. (2017)	Linfócitos T	Diminuição de IFN γ , IL-2 e TNF α
CHE et al. (2012)	Células B	Supressão da proliferação e proliferação

De acordo com a literatura, a capacidade imunomoduladora da CTM não está necessariamente relacionada com a capacidade tronco mesenquimal. Como exemplo, alguns estudos apontam que fibroblastos e CTM apresentam alta similaridade do padrão de expressão de genes e proteínas relacionadas à imunomodulação (GEBLER et al., 2012; CHABORD, 2010). HANIFFA et al. (2007) investigaram se fibroblastos da derme eram capazes de imunomodular células T, assim como é a CTM. Os fibroblastos foram isolados a partir de biópsia de pele humana e cultivados com passagens de ciclos de aderência aos frascos de cultura, com marcação de > 90% de células CD73+ e negativas para CD45, e diferenciação nas três linhagens (condrócitos, osteoblastos e adipócitos). Para comparação, foram isoladas CTM de humanos. Os autores verificaram similaridades no padrão de cultivo e diferenciação entre CTM e fibroblastos da derme até a passagem 6, e que este último foi capaz de manter as características clonogênicas em torno de 50 % e ainda foi capaz de inibir a proliferação de células T.

Alguns trabalhos têm apontado que a CTM pode atuar no reparo às lesões teciduais (SHI et al., 2012). Lesões teciduais são acompanhadas de quadro inflamatório e ativação de várias células imunes, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, e ativação de células endoteliais e fibroblastos. Conseqüentemente, há secreção de diversas citocinas inflamatórias, radicais livres e leucotrienos, que são produzidos por diferentes tipos celulares nesse microambiente (MA et al., 2014). Nesse contexto, as CTMs são recrutadas até esse ambiente e acabam por serem ativadas pelas moléculas secretadas pelas células ali presentes. O próximo passo é controlar a ativação e proliferação de células como linfócitos, e secretar uma série de fatores de crescimento, como por exemplo, EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TGF β (*Transforming Growth Factor- β*), entre outros, que possam melhorar a resposta de fibroblastos e células endoteliais, e assim otimizar o processo de reparação tecidual. De uma forma muito resumida, esse é o mecanismo base de reparo tecidual exercido pela CTM (UCELLI, 2008; SHI et al., 2010;2012; MA et al., 2014; LI & HUA, 2017). Contudo, WEISS & DAHLKE (2019) observaram que os efeitos da CTM não mediado por citocinas também representa uma parte importante do processo de imunomodulação por essas células. Nessa revisão, os autores discutem uma série de trabalhos em modelos experimentais que mostram: i) que a CTM derivada do tecido adiposo fagocitada por macrófagos alveolares contribui para a polarização

dessa última para um fenótipo tipo M2; ii) que a CTM, mesmo em processo de apoptose, pode exercer efeitos imunomoduladores quando administradas por via intravenosa e iii) que HI-MSCs (CTMs inativadas pelo calor e não secretora de citocinas) são capazes de atenuar a resposta inflamatória. Ainda, dados da literatura mostram que vesículas extracelulares de CTMs apresentam propriedades terapêuticas imunomodulatória positiva tanto em modelos experimentais de doença renal, fígado e cardíaca, com foco na inflamação e proliferação celular, mas também em estudos clínicos que investigaram o potencial da administração dessas vesículas em indivíduos acometidos por doença enxerto-versus-hospedeiro refratária a esteróide e na doença crônica de rim, com resultados promissores durante o tratamento (KORDELAS et al., 2014; NASSAR et al., 2016; BÖRGER et al., 2017).

2.2.3 Mg²⁺ e Célula Tronco Mesenquimal (CTM)

Alterações na homeostase de Mg²⁺ estão associadas com inflamação de baixo grau, aumento do estresse oxidativo, diminuição da proliferação celular e alterações ósseas (CASTIGLIONE et al., 2013; NIELSEN, 2018).

Nas últimas décadas, a relação entre a interação da CTM e Mg²⁺ e suas implicações no tecido esquelético tem sido investigada, e é essa a área que abrange a maior parte dos estudos, com crescente número de trabalhos que relacionam o uso de ligas a base de Mg²⁺ e CTM, principalmente devido às características desse mineral, como alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, e seus efeitos na biologia da CTM, com ênfase nos mecanismos relacionados à diferenciação celular e reparo ósseo (YOSHIZAWA et al., 2015; WU et al., 2014; LUTHRINGER & WILLUMEIT-RÖMER, 2016; HUNG et al., 2019). Por outro lado, há poucas investigações no que se refere a capacidade da CTM em regular outros tipos celulares em diferentes concentrações de Mg²⁺. Mesmo na área da implantologia, onde se concentra a maior parte dos estudos que relacionam Mg²⁺ e CTM, não está totalmente claro os efeitos biológicos resultantes da alteração da concentração desse mineral na biologia da CTM. Por um lado, evidências apontam que o enriquecimento com Mg²⁺ nos cultivos celulares podem auxiliar na proliferação, diferenciação, e ajudar no reparo tecidual e controle da inflamação (CIFUENTIS et al., 2016), e que a diminuição na concentração desse mineral pode alterar os

processos de diferenciação. Nesse contexto, Zheng et al. (2016) avaliaram o papel desse mineral e de seu transportador MagT1 (Magnesium Transporter Subtype 1) *in vitro*, nas CTMs provenientes da medula óssea de ratos. Para o cultivo celular, foi utilizado meio osteoindutivo com 0,1 mM Mg²⁺ ou 0.8 mM Mg²⁺. A expressão de mRNA de MagT1, ALP, COL-1 e RUNX2 foram analisados por qPCR que demonstrou aumento da expressão de mRNA de MagT1, e diminuição da expressão de mRNA de ALP, COL-1 e RUNX2 no meio com 0,1 mM Mg²⁺. Os resultados indicaram redução nos processos de diferenciação osteogênica em condições de cultura com baixa concentração de Mg²⁺. Contrário a esses achados, Sargenti et al. (2018) investigaram, *in vitro*, a relação entre a alteração na homeostase de Mg²⁺ e sua influência sobre a diferenciação e reprogramação de CTMs derivadas do tecido adiposo (AD-MSCs) e da medula óssea (BM-MSCs) humanas. As células AD-MSCs foram cultivadas com meios contendo 0,1 ou 1 mM Mg²⁺ /L por 5 e 10 dias, e 0,1 mM Mg²⁺ /L por 5 dias e suplementadas com 1 mM Mg²⁺ /L por mais 5 dias com ou sem meio de reprogramação (RM). Após esse período, foi avaliada a expressão de genes relacionados à multipotência (GATA-4, NKX-2.5, HGF, KDR, NEUROG e NANOG) e os resultados mostraram um significativo aumento na expressão desses genes em células tratadas com RM e meio deficiente em Mg²⁺. Em seguida, os autores investigaram o impacto da diminuição na concentração de Mg²⁺ na diferenciação de BM-MSCs em osteoblastos, e mostraram que a deficiência de Mg²⁺ foi reversível, acelerou a diferenciação de BM-MSCs em osteoblastos, e que esse mecanismo poderia ser explicado em parte devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, Zhang et al. (2014) avaliaram o efeito do aumento da concentração de Mg²⁺, *in vitro*, na mineralização da matriz em CTM derivadas da medula óssea de humanos. Foi observado que na concentração $\geq 1,3$ mM Mg²⁺ no meio de cultivo osteoindutivo houve inibição da mineralização da matriz de maneira dose dependente, e que o aumento do Mg²⁺ interferiu na sinalização intracelular de Ca²⁺ e inibiu a liberação espontânea de ATP (interferindo na oscilação de Ca²⁺). Assim, os autores concluíram que o aumento da concentração de Mg²⁺ no ambiente tecidual (derivado da corrosão local da liga), poderia levar a uma alteração dos processos dependentes de Ca²⁺ e alterar a função da CTM. Maradze et al. (2018) também investigaram o impacto da corrosão de implantes com diferentes concentrações de Mg²⁺ (1.0, 2.8, 4.5, 9.9 e 15.9 mM) em CTMs humanas *in vitro*, e observaram que essas células foram capazes de tolerar altas concentrações desse íon (16 mM),

porém, apenas concentrações abaixo de 10 mM impactaram positivamente no crescimento celular.

Assim, esses estudos mostram que ambos, Mg^{2+} e CTM possuem papel importante, tanto na regulação da homeostase do sistema imune (descrito anteriormente), quanto nos processos de proliferação e diferenciação dessa célula, visto que i) a CTM interage com diferentes tipos de células imunes e secreta inúmeras moléculas que desempenham papel no reparo à lesão tecidual e controle da resposta imunológica e ii) o Mg^{2+} atua como regulador central dos processos de diferenciação e proliferação, e ainda como um mineral com potencial anti-inflamatório. Nesse contexto, é de se questionar se alterações na concentração de Mg^{2+} podem modificar a capacidade de imunomodulação da CTM. Como podemos observar, a influência de diferentes concentrações de Mg^{2+} na capacidade da CTM em manter a homeostase e modular outras células imunes no contexto inflamatório e de reparo à lesão parece ser complexa, e não está totalmente esclarecida.

2.3 Hematopoese

2.3.1 Aspectos gerais

Estudos pioneiros desenvolvidos por Maximow (1924), Ray Owen (1945), Till & McCulloch (1961) e outros (PAPAYANNOPOULOU & SCADDEN, 2008; WEISSMAN et al., 2008; ZHANG et al., 2018) tornaram possível a compreensão sobre a célula tronco hematopoiética e a hematopoese. Juntos, esses e outros trabalhos mostraram que a hematopoese é um processo complexo, dinâmico e contínuo, no qual células tronco hematopoiéticas (CTH) pluripotentes proliferam, se diferenciam e se comprometem para as linhagens mielóide ou linfóide, originando os diferentes tipos celulares que compõem o sistema sanguíneo. Esse processo é altamente regulado para que o sistema hematopoiético forneça diariamente ao organismo milhares de células sanguíneas maduras, que exercem diversas atividades essenciais à sobrevivência do organismo, como transporte de oxigênio, regulação da homeostase sanguínea, controle das imunidades inata e adaptativa entre outros (ORKIN & ZON, 2008; RIEGER & SCHROEDER, 2012). Schofield (1978) foi pioneiro ao propor o conceito de um nicho, na medula óssea para abrigar a célula tronco hematopoiética (CTH), também conhecido como 'nicho endosteal'. O nicho

endosteal da medula óssea foi definido como um local anatômico com a capacidade de manter a homeostase da CTH em diferentes compartimentos, sendo que a CTH poderia se abrigar em um local e em outro os processos de diferenciação eram inibidos, e um compartimento diferente onde elas poderiam se sustentar e se reproduzir. Além disso, Schofield (1978) também propôs a importante interação do contato célula/célula para o microambiente medular. Além do nicho endosteal, há também a caracterização de um ‘nicho vascular’, um ambiente que favorece os processos de diferenciação celular e sua mobilização para a circulação periférica. Nesse microambiente há a presença de diversos tipos celulares em diferentes estágios de maturação, células estromais, endoteliais e reticulares, fatores solúveis (citocinas e fatores de crescimento), matriz extracelular, que formam um parênquima de sustentação que mantém e regulam a CTH e a hematopoese (KOPP et al., 2005; MORRISON & SCADDEN, 2014). Os processos de comprometimento celular, diferenciação e proliferação que ocorre no microambiente da medula óssea são altamente regulados, e os fatores iniciadores e que determinam a diferenciação da célula tronco hematopoiética não estão totalmente claros (LAWRENCE et al., 2018). Por isso, a literatura traz a luz dois modelos principais para explicar a produção de células sanguíneas, chamado de “modelo clássico” ou “hierárquico” e esse mesmo modelo, mas “revisado” chamado “hierarquia revisada”. Em ambos, a célula tronco hematopoiética está no topo da hierarquia e em menor número e as células maduras em maior número, na base do modelo proposto (AKASHI et al., 2000). Porém, diante de novas ferramentas de investigação das ciências ômicas nas últimas décadas, tem sido proposta uma revisão do modelo clássico (Figura 2).

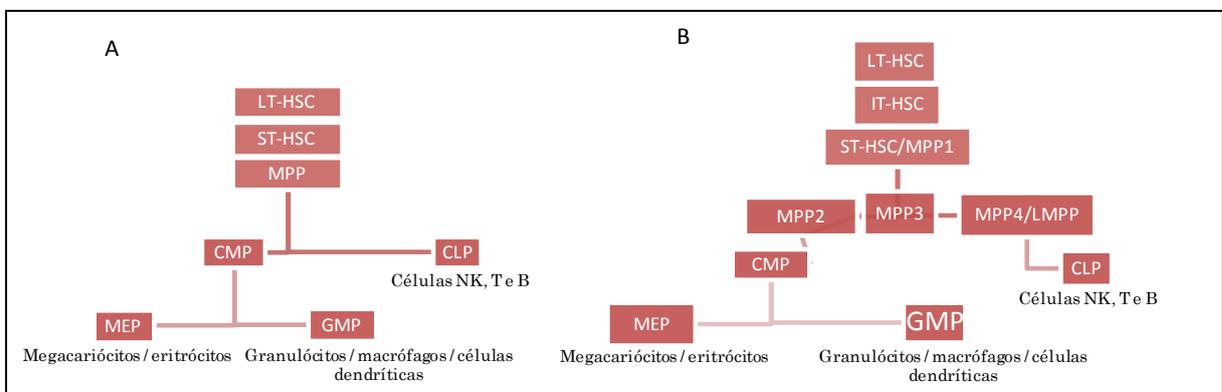


Figura 2: Hematopoese. Esquema da hierarquia clássica (A) da hematopoese e da hierarquia revisada (B). LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell; IT-HSC, intermediate-term hematopoietic stem cell; ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell; MPP, progenitor multipotente; LMPP, progenitor multipotente iniciador linfóide; CMP, progenitor mielóide comum; CLP, progenitor linfóide comum; MEP, progenitor eritróide / megacariócito; GMP, progenitor granulócitos / macrófagos (Adaptado de: Zhang Y. et al., 2018).

Dentro do contexto do modelo da hierarquia revisada, ZHANG et al. (2018) sugere que a população de CTH é mais heterogênea e que LT-HSC (long-term hematopoietic stem cell) são células em menor número e em estado quiescente, e que possui grande capacidade de autorrenovação, enquanto ST-HSCs (short-term hematopoietic stem cell) tem essa capacidade limitada, e entre essas duas populações há uma população de células transitória com capacidade de autorrenovação, chamada IT-HSC (Intermediate-term HSC). Sob essa perspectiva, o progenitor multipotente (MPP) seria dividido em MPP1, MPP2, MPP3 e MPP4, sendo que MPP1 seria mais similar as ST-HSCs, e as demais populações seriam a base da sustentação e produção das células maduras, assim como no esquema da hierarquia clássica. Resumidamente, esses são os modelos básicos propostos na literatura, em relação à produção de células do sangue na medula óssea. Alterações no microambiente medular podem impactar negativamente nos processos de proliferação, comprometimento, amadurecimento e morte celular, resultando em doenças hematológicas como anemia e leucemias.

2.3.2 Magnésio e hemopoese

O tecido hematopoético é regulado e influenciado por diversos estímulos que mantém sua homeostase, e pela combinação de diversas citocinas produzidas no microambiente hematopoético e em outros tecidos (OGAWA, 1993; SMITH, 2003; RIEGER & SCHROEDER, 2012; ZHANG & LODISH, 2008). Além disso, por ser um tecido com elevada taxa de renovação, é fortemente influenciado pela disponibilidade de nutrientes, que são indispensáveis para a progressão do ciclo celular (BOHNSACK & HIRSCHI, 2004). Nos últimos anos, tem sido demonstrado como a nutrição e o estilo de vida pode interferir no microambiente hematopoético e em todas as etapas do desenvolvimento e função celular, principalmente nas células que compõem o sistema imune (XAVIER et al., 2007; BORELLI et al., 2009; NAHRENDORF & SWIRSKI, 2015).

O Mg^{2+} é um mineral de alta relevância para as células, atuando como ativador de diversas enzimas relacionadas aos processos de proliferação, diferenciação e apoptose. Portanto, a concentração intra e extracelular desse mineral parecem ser importantes para a homeostase celular e a hipomagnesemia poderia interferir nesses processos (WOLF & CITTADINI, 1999; AHMED & MOHAMMED, 2019). Se

por um lado, há dados na literatura que mostram a importância da relação entre Mg^{2+} e a célula tronco mesenquimal, que é uma célula que apresenta papel chave para o suporte e sustentação do tecido hematopoético (TAICHMAN, 2005), por outro, os dados da literatura que mostram como esse mineral pode afetar as células na medula óssea são limitados. A maioria dos trabalhos experimentais tem demonstrado o impacto da hipomagnesemia sobre as células do sangue periférico (MALPUECH-BRUGÈRE et al., 2000; VAN ORDEN et al., 2006) ou o papel do canal TRPM7 (e sua relação com o Mg^{2+}) para os processos de linfopoese e trombopoese (KRISHNAMOORTHY et al., 2018; STRITT et al., 2015), mas a influência da deficiência desse mineral sobre as células na medula óssea tem sido pouco investigada. Um estudo experimental desenvolvido por McCreary et al. (1967) mostrou em ratos, as repercussões da deficiência de Mg^{2+} por 7 e 10 meses na celularidade da medula óssea. Nesse trabalho, os ratos foram divididos em 4 grupos: grupo A controle; grupo B controle com adição de 60 mg de 2-AAF/100g de ração (2-acetilaminofluoreno - um agente carcinogênico - pois alguns dados prévios mostravam que a hipomagnesemia poderia causar leucemia); grupo C deficiente em Mg^{2+} ; grupo D deficiente em Mg^{2+} com adição de 60 mg de 2-AAF/100g de ração. Após o tratamento, foi realizado o mielograma para avaliação dos efeitos sobre a medula óssea. Os dados apresentados mostraram que no grupo controle a medula apresentou-se normocelular e nenhum animal apresentou leucemia. No grupo B (controle + 60 mg de 2-AAF), todos os animais apresentaram tumores e um animal apresentou leucemia granulocítica. No grupo C (deficiente em Mg^{2+}), o mielograma de 14 animais apresentou-se normocelular e 8 hipercelular, sendo que nesse último havia maior porcentagem de células da série granulocítica e um animal apresentou leucemia. Esse animal leucêmico apresentou infiltrado granulocítico em vários órgãos, e uma suspensão de células infiltradas no baço injetada em ratos recém-nascidos foi capaz de resultar em leucemia em metade dos animais inoculados após 3 meses, com achados similares ao primeiro experimento. No grupo D, todos os 24 animais apresentaram tumores, 21 apresentaram a medula hipercelular, hiperplasia eritrocítica e aumento de granulócitos, e um animal mostrou quadro de leucemia. Esse trabalho confirmou que a alteração na homeostase de Mg^{2+} levou a alterações na celularidade da medula óssea, mas os mecanismos envolvidos foram pouco elucidados. Diante do exposto, nosso trabalho busca esclarecer as repercussões da deficiência de Mg^{2+} sobre as células da medula óssea num modelo experimental.

Abordagens atuais de pesquisa foram utilizadas na tentativa de elucidar os mecanismos que possam estar envolvidos na alteração da celularidade da medula óssea em condições de hipomagnesemia.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a influência do magnésio sobre a capacidade imunorreguladora da célula tronco mesenquimal e células hematopoéticas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Específicos

- ✓ Investigar em modelo experimental *in vitro* a influência de diferentes concentrações de magnésio na capacidade imunorreguladora da célula tronco mesenquimal;
- ✓ Avaliar o impacto da deficiência de magnésio em modelo experimental *in vivo* sobre as células do sangue periférico e da medula óssea, e a expressão de genes e fatores de transcrição relacionados à proliferação e diferenciação celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

4.1.1 C3H/10T1/2 clone 8 (ATCC® CCL-226™)

Avaliamos *in vitro* cultivos de células C3H/10T1/2 clone 8 (ATCC® CCL-226™ Manassas, VA, USA) com meios de cultura enriquecidos ou não com diferentes concentrações de Mg^{2+} (0, 1, 3 e 5 mM Mg^{2+} / L) por 24 h. A célula C3H/10T1/2 possui características semelhantes a célula tronco mesenquimal, ou seja, morfologia tipo fibroblasto, aderente ao plástico e com capacidade de se diferenciar nas 3 linhagens específicas (osteoblastos, adipócitos e condrócitos).

4.1.2 Condições de cultura

As células foram cultivadas de acordo com as instruções do fornecedor. Foi utilizado meio de cultura estéril DMEM baixa glicose (Dulbecco's modified Eagle medium, Atena, Campinas, São Paulo) suplementado com 10 % de SBF estéril (VS0011 Vitrocell, Campinas, São Paulo) 100 UI / mL de penicilina G sódica (P3032-10MU-Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e 100 ug / mL de estreptomicina (S9137-25G-Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA), em atmosfera contendo 5% CO_2 à 37°C. Após aderência, quando atingiram 60 % de confluência as células foram lavadas com PBS tripsinizadas e novamente plaqueadas na concentração de 5×10^5 células para realização dos experimentos.

4.1.3 Suplementação dos cultivos com Mg^{2+} e geração dos 'meios condicionados'

Após aderência e quando as células atingiram em torno de 60 % de confluência, o sobrenadante foi retirado e a monocamada de células foi lavada com PBS. Após, foi adicionado um novo meio de cultivo DMEM com 10% SBF e 100 UI / mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e 100 ug / mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA), com as seguintes concentrações de $MgSO_4$: 0,0 mM, 1,0 mM, 3 mM e 5 mM / L. A cultura foi mantida por 24 h e após

esse período, os cultivos foram ou não estimulados com 1,25 ug / mL de lipopolissacarídeo (LPS L-8274 100mg Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e 10 ng / mL de TNF α (DY410 R&D Systems, Minneapolis, EUA) por 2 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, e separado uma alíquota para dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias e outra para a geração dos 'meios condicionados', ambos armazenados a – 40°C. A seguir, as células foram ou não tripsinizadas para realização dos demais protocolos experimentais.

4.1.4 RAW 264.7

A linhagem Raw 264.7 (mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) foi escolhida por possuir características e morfologia tipo monócito / macrófago. Essas células foram cultivadas de acordo com as instruções do fornecedor. Foi utilizado o meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium, Atena, Campinas, São Paulo) suplementado com 10 % de SBF estéril (VS0011 Vitrocell, Campinas, São Paulo) e 100 UI / mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e 100 ug / mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA), em atmosfera contendo 5% CO₂ à 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias.

4.1.5 Cultivo da RAW 264.7 com 'meios condicionados'

Quando o cultivo atingiu aproximadamente 60 % de confluência, as células foram submetidas a contagem e plaqueadas novamente 5 x 10⁵ células / poço em placa de 24 poços. Após 24 h de cultivo, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado o 'meio condicionado' com e sem estímulo de LPS e TNF α por 24 h. Os cultivos usados como controles foram estimulados ou não pelo mesmo período. Após 24 h, o sobrenadante foi retirado e armazenado a – 40 °C para dosagem de citocinas, e as células submetidas a ensaio para avaliar proliferação por MTT.

4.2 Avaliação do ciclo celular em células C3H/10T1/2 por citometria de fluxo

Antes de dar início ao protocolo experimental, acrescentamos a etapa de carenciamento celular para sincronizar os cultivos na fase G₀/G₁. Nessa etapa, as

células foram cultivadas por 24 h com meio de cultura DMEM 0.5 % de SBF. Após esse período, o cultivo celular foi realizado como descrito no item 4.1.2, e depois as células foram tripsinizadas, e a seguir a tripsina foi neutralizada com meio de cultura. A suspensão foi centrifugada por 5' a 1000 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado 300 uL de solução de etanol 70 % e incubada por 20' em banho de gelo. Após esse período, foi adicionado 4 mg / mL de RNase por 30'. Para a marcação do DNA, as células foram incubadas com 5 uL de Iodeto de Propídio (BD Pharmigen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA) por 30'. Logo depois, foi adicionado 200 uL de PBS para aquisição dos dados por citometria de fluxo (FACScan® BECTON DICKSON, San Jose, EUA). A análise do ciclo celular foi realizada quantificando-se a porcentagem das regiões G0/G1, S/G2/M no programa FlowJo, LLC.

4.3 Análise da apoptose e necrose por citometria de fluxo

A análise da apoptose e necrose foi realizada com a marcação das células com Anexina V – FITC e Iodeto de Propídio (PI). O método se baseia na marcação com Anexina V - FITC positiva quando há modificação da membrana plasmática da célula e subsequente exposição da fosfatidilserina, que sinaliza o início da apoptose. A Anexina se liga ao fosfolipídio na presença de íons Ca^{2+} que, conjugada com FITC (fluorescein isothiocyanate) torna possível sua quantificação por citometria de fluxo. O Iodeto de Propídio (PI) se intercala ao DNA desde que a membrana esteja permeável. Marcadores de DNA de alto peso molecular, como o PI não penetram na célula intacta, dessa forma a marcação positiva indica alterações na permeabilidade da membrana. Assim, células FITC – PI – indicam as células viáveis, FITC + PI – apoptose e FITC+ PI+ apoptose e necrose tardia.

Após o cultivo celular como descrito no item 4.1.2, as células foram tripsinizadas e a seguir a tripsina foi neutralizada com meio de cultura. A suspensão foi centrifugada por 5' a 1000 rpm e o sobrenadante descartado. Após, as células foram lavadas com PBS (5' a 1000 rpm) e o excesso de PBS removido. A seguir, foi adicionado Anexina V – FITC (2,5 uL por amostra) e Iodeto de Propídio (BD Pharmigen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA) 8 uL por amostra e tampão anexina. Logo após, as células foram incubadas por 20' ao abrigo da luz e após esse período foram enviadas para aquisição dos dados por citometria de fluxo

(FACScan® BECTON DICKSON, San Jose, EUA) foi adicionado novamente tampão anexina (200 uL / amostra). A análise foi realizada de acordo com a % de células marcadas ou não, para um ou ambos marcadores Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio, utilizando o programa FlowJoVX.

4.4 Análise da proliferação relativa por MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio)

O método MTT baseia-se fundamentalmente na capacidade da célula em reduzir metabolicamente o sal de MTT, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica em cristais de formazan de cor azul púrpura que se acumulam no citoplasma celular (MOSMANN, 1983). Dessa forma, o ensaio de MTT avalia a atividade mitocondrial representativa de células viáveis pela quantificação da atividade de desidrogenase.

Após 24 h de cultivo das células com diferentes concentrações de Mg^{2+} com e sem estímulos (LPS, $TNF\alpha$), o sobrenadante foi retirado, o poço lavado com PBS e a seguir adicionou-se 100 uL / poço da solução de MTT (5 mg/ mL) (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA). A placa foi incubada por 2 h na estufa a 37°C. Logo após esse período, a solução de MTT foi retirada e a seguir adicionou-se 100 uL / poço de isopropanol para a dissolução dos cristais de formazan. Por último, as células foram incubadas overnight em temperatura ambiente e a absorbância dos cristais de formazan dissolvidos foi medida em espectrofotômetro (Bio-Teck® Instrumentals, Winoosk, EUA) em 570 nm.

4.6 Imunofluorescência

Para investigar a expressão de TRPM7 nas células C3H/10t1/2 foi realizado o protocolo a seguir. Após cultivo celular descrito no item 4.1.2, o sobrenadante foi descartado e o poço lavado com PBS e o bloqueio a ligações inespecíficas foi feito adicionando ao poço PBST e 1 % BSA por 30 minutos. As células foram fixadas incubando-se com 4 % de paraformoldeído por 20 minutos. Após esse período, o fixador foi descartado e o poço lavado com PBS. As células foram incubadas com glicina (0.1 M) por 15 minutos e após, lavado novamente com PBS. O anticorpo primário (TRPM7 AB109438, Abcam, MA, EUA) foi diluído 1:250 com PBST e BSA 1% por 4 h. Logo depois o poço foi lavado com PBS e adicionou-se o anticorpo

secundário conjugado por 1 h. O poço foi lavado com PBS por 2 x e incubado com DAPI (1 ug / mL) por 1 minuto. A seguir a marcação foi visualizada em microscópio de imunofluorescência.

4.7 Análise do Mg²⁺ no meio de cultura e intracelular

A concentração do Mg²⁺ foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (Perkin Elmer AAnalyst 100, Winter St. Waltham, Massachusetts, Miami, FL, EUA), empregando-se lâmpadas de cátodo oco 202,6 e 285,2, e fenda de 0,7 nm, respectivamente, após digestão de 500 uL de amostra com HNO₃ v/v, e diluição com água e adição de 0,1% de lantânio, como La₂O₃. Curva-padrão foi preparada pela diluição do padrão de Mg²⁺ (MgCl₂) em HNO₃ (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha). A qualidade das análises foi monitorada pelo controle das leituras do padrão primário (National Institute of Standards & Technology, MD, EUA).

4.8 Animais

Camundongos C57Bl/6, machos, adultos foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura (22±2°C) e umidade (55%) controladas e ciclos de claro/escuro de 12h.

4.8.1 Delineamento Experimental

Os animais (n=24) passaram por um período de 7 dias para adaptação às condições ambientais do ensaio. Após esse período, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais. Um grupo recebeu dieta AIN93M (REEVES, 1993) e o outro grupo recebeu dieta AIN93M com 10 % das recomendações de Mg²⁺ para roedores, por 4 semanas. Ração e água foram oferecidas *ad libitum* durante o período experimental. Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados após administração intramuscular de quetamina (100 mg / Kg / peso), associado ao cloridrato de xilazina (10 mg / Kg / peso), e posterior exsanguinação de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2015).

4.9 Obtenção de sangue total e soro

As amostras sanguíneas foram obtidas a partir do plexo axilar dos camundongos previamente anestesiados. Amostras sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção de soro que foi separado por centrifugação (2000Xg por 10 minutos) a 4°C e utilizados para dosagem de magnésio e cálcio. Para obtenção de sangue total e plasma as amostras foram coletadas com EDTA 10% (1mg / mL), o qual foi utilizado para a realização do hemograma.

4.10 Hemograma

O hemograma foi realizado com amostra de sangue total colhido com EDTA (1mg/mL). A contagem total de leucócitos, hemácias, plaquetas, determinação de hemoglobina e hematócrito foram determinadas pelo analisador automático de células sanguíneas ABC vet (ABX diagnostics). A contagem diferencial de leucócitos foi determinada a partir de extensões sanguíneas coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa (ROSENFELD, 1947). As extensões coradas foram analisadas por microscópio óptico e no mínimo 100 leucócitos foram contados.

4.11 Obtenção de células da medula óssea e mielograma

Após eutanásia foi retirado o fêmur esquerdo, seguido do corte das epífises. As células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade femoral com 0,5 mL de meio de cultura DMEN (SIGMA[®], CHEMICAL COMPANY, USA). A suspensão celular obtida foi utilizada para contagem do número total de células nucleadas em câmara de Neubauer (utilizando-se como diluente o líquido de Turk) e para a confecção de lâminas obtidas por citocentrifugação e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

4.12 Imunofenotipagem para quantificação de células

Para a identificação das diferentes populações de células hematopoiéticas, foram utilizados anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos: Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Ficoeritrina/Cianina 7 - PECy7 e Alofocianina (APC) e analisamos 3×10^6 células/amostra. As amostras foram marcadas com os anticorpos por 20 min. Para tanto foram utilizados 10 μ l dos

respectivos anticorpos abaixo (diluídos na proporção de 1:200 com PBS + albumina 1% + Azida 0,05%). As amostras permaneceram incubadas por 20 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em um volume de 250 µl de PBS para aquisição das amostras no citômetro de fluxo. A análise foi realizada utilizando o software Cell Quest (Becton Dickinson, versão 3.4) e FlowJo. Foram utilizados os lasers de argônio 488 nm e o diodo laser 633 nm. A emissão da fluorescência foi capturada no canal correspondente (FITC: FL-1; PE: FL-2; PE: PEcy7: FL-3; APC: FL-4). Segue abaixo a descrição dos painéis de anticorpos utilizados para identificação das populações nas diferentes amostras em estudo:

Medula óssea

Painel 1 (Linfócitos T): CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE;

Painel 2 (Eritrócitos, Linfócitos B e NK): Ly6G-APC, TER119-PE, B220-FITC, CD19-PerCP-Cy5.5, CD49b-APC, NK1-FITC;

Painel 3 (Células maduras mielóides): F4/80-APC, CD11b-FITC, Gr1-PE.

Painel 4 (Células-tronco e progenitores hematopoéticos): CD90.1-PECy7, Sca-1-FITC, FLk2-PE, c-Kit-APC e coquetel para marcação de linhagens maduras (Lin) todos conjugados com PE (CD11b, CD3, CD19-PE, Ter119, Gr-1);

Painel 5 (Progenitores Mielóides Hematopoéticos): CD34-FITC, Sca-1-PE e IL-7-PE, c-Kit-Cy7/APC, FcR γ -PECy7 e coquetel para marcação de linhagens maduras (Lin) todos conjugados com PE (CD11b, CD3, Ter119, Gr-1, CD19).

4.14 Determinação da expressão de NF κ B (total e fosforilado), STAT3 (total e fosforilado) e PCNA por Western Blot

Após o cultivo celular descrito no item 4.1.2 foi determinado por Western Blot a expressão de NF κ B (total e fosforilado) e STAT3 (total e fosforilado) e PCNA. O protocolo será descrito a seguir.

4.14.1 SDS-PAGE e Western blot

4.14.2 Preparo do gel de poliacrilamida

O procedimento foi realizado conforme protocolo de SAMBROOK et al. (1989) e HARLOW & LANE (1988). Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada

superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

4.14.3 Preparo do lisado de proteínas para SDS-PAGE e Western blot

Os lisados foram preparados a partir de 5×10^5 células em 200 μ L de tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL leupeptina, 100 μ g/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi sonificado (30 segundos), centrifugado por 10 minutos à 14.000 rpm a 4 °C. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford, utilizando um kit comercial (BCA™ protein assay kit®, Pierce, Rockford, EUA). O sobrenadante quantificado, foi misturado ao tampão de amostra (3 x concentrado, 100 mM Tris.HCl, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol), fervido por 10 minutos para denaturação das proteínas e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida juntamente com o padrão de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, ThermoFisher).

4.14.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana nitrocelulose

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 minutos em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e então também incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: 3 folhas de papel filtro, gel, membrana, 3 folhas de papel filtro. A transferência foi realizada em cuba de eletroforese com o tampão de transferência, sob corrente de 100 V e 400 mA, até que as amostras percorressem todo o gel. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5 - 10 minutos com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com água destilada ou PBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,9 %). Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h com solução de bloqueio para sítios inespecíficos (BSA 5 % em PBST). Após esse período a membrana foi lavada 3 x com PBST dando prosseguimento a etapa de sondagem.

4.14.5 Sondagem das proteínas com anticorpos

Os anticorpos anti- NF κ B [total (Catálogo SC-33039, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-372, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e anti-STAT3 [total (Catálogo SC-482, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-8001, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e PCNA (PC-10, Catálogo SC-56) foram diluídos em PBST e 3 % de BSA nas seguintes concentrações: 1:1000 (anti- NF κ B total), 1:1000 (anti- NF κ B fosforilado), 1:250 (STAT3 total) e 1:250 (STAT3 fosforilado), 1:1000 (PCNA). A membrana foi incubada overnight. Após esse período, a solução com o anticorpo foi retirada e a membrana foi lavada 3 X com PBST. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com biotina, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), na diluição 1:10000 em PBST e BSA 3 % por 2 h. Após, o anticorpo secundário foi retirado e a membrana lavada 3 X com PBST. Prosseguiu-se com a revelação.

4.14.6 Revelação com sistema quimioluminescente

A revelação foi realizada utilizando-se o Kit ECL Select (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio) (ECL Select Western Blotting Detection Reagents[®], Amersham Biosciences, Pittsburg, EUA). As aquisições e análises foram feitas no equipamento UVITEC Alliance 4.7 (Cambridge, UK) e a β -actina utilizada como padrão para quantificação das bandas formadas.

4.15 Determinação de citocinas por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

As citocinas foram dosadas por ELISA (Quantikine[®] ELISA, R&D Systems, Abingdon, UK), seguindo as orientações do fabricante.

4.16 Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi obtido a partir de células da medula óssea *ex vivo*, usando o kit de extração de RNA RNeasy (Qiagen, Germantown, MD) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA total foi transcrito reversamente em cDNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster

City, CA). Amostras de cDNA foram amplificadas utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix, com concentrações otimizadas do conjunto de primers para CSF1 (Mm00432686_m1), CSF2 (Mm01290062_m1), CSF3 (Mm00438335_g1), CCND1 (Mm00432359_m1), CDKN1b (Mm00438168_m1), CEBP α (Mm00514283_s1), SPI1 (Mm00488142_m1), CSF3R (Mm00432735_m1), GATA-1 (Mm01352636_m1), GATA2 (Mm00492301_m1) e GATA3 (Mm00484683_m1). A expressão gênica foi normalizada pela expressão gênica de Gapdh (Mm99999915_g1). O conjunto de primers foi adquirido da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). O gene de expressão foi avaliado por PCR em tempo real usando StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) e quantificado de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$.

4.17 Ensaio de Metilcelulose

Para analisar as unidades formadoras de colônias, foram coletadas células da medula óssea de animais controles e deficientes em Mg²⁺, e as células mononucleares foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade usando o protocolo Ficoll-Histopaque (Sigma Aldrich, EUA). 5 x 10⁴ células / mL foram colocadas em placas em meio metilcelulose. Para os procedimentos, utilizou-se o meio MethoCult™ (GF M3534, STEMCELL Technologies, Inc., Canadá) como um meio contendo Mg²⁺ e, para um meio deficiente em Mg²⁺, foi preparado um meio semi-sólido à base de metilcelulose com meio Iscove's sem Mg²⁺ e adicionado, Metilprednisolona 10⁻⁴ M (Abbott, Brasil), 2-mercaptoetanol 10⁻² M (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 0,2 ng / mL rmGM-CSF (Sigma Chemical Company®, EUA), 0,2 ng / mL rmG-CSF (Sigma Chemical Company®, EUA) e 0,1 ng / mL de IL-3 (Sigma Chemical Company®, EUA). As células foram diluídas no meio e incubadas por 3 minutos para remover bolhas, e 1 ml foi pipetado em cada poço da placa de cultura de células de 6 poços (em duplicata). As células foram incubadas por 14 dias em uma incubadora de CO₂ a 5% a 37 ° C. Após 14 dias de cultura, as colônias totais foram contadas sob um microscópio óptico com ampliação de 40x (Carl-Zeiss, Alemanha), e quantificados os números de células formadoras de colônias granulocíticas (CFU-G).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa GraphPad (Software Inc, versão 5.0.1, San Diego, EUA). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Gaussiana. Os dados (*in vitro*) foram analisados com *One way* ANOVA e o pós teste de Dunnett, para verificar o efeito de diferentes concentrações de Mg^{2+} sobre as variáveis dependentes. Para verificar a ação combinada de diferentes concentrações de Mg^{2+} no meio controle e no meio condicionado, os dados foram submetidos a análise estatística com *Two-way* ANOVA e o pós teste de Bonferroni. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando o $p \leq 0,05$. Os conjuntos de dados comparando os grupos controle e deficiente em Mg^{2+} (*in vivo*) foram analisados pelo teste t de Student, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

Capítulo 1

6.1 Determinação da concentração de Mg^{2+} no meio de cultura

Os meios de cultura foram analisados e foi possível confirmar que o enriquecimento do meio apresentava a quantidade de Mg^{2+} esperada. Além disso, também observamos diminuição da concentração extracelular desse mineral quando as células foram cultivadas por 24 h, sendo esse efeito mais pronunciado nos cultivos com 3 e 5 mM Mg^{2+} / L.

Tabela 3. Concentração de Mg^{2+} extracelular antes e após cultivo de 24 h

mM $MgSO_4$ / L	Mg^{2+} (mM / L) antes	Mg^{2+} (mM / L) depois
0	$0,0 \pm 0,002$	$0,1 \pm 0,02$
1	$1,0 \pm 0,002$	$0,97 \pm 0,05$
3	$3,0 \pm 0,005$	$2,5 \pm 0,22$
5	$5,0 \pm 0,005$	$3,0 \pm 0,5$

Resultados da análise da concentração de Mg^{2+} por AA nos meios de cultura, representados pela média \pm erro padrão.

6.1.2 Determinação da concentração intracelular de Mg^{2+} nas células C3H/10T1/2 após 24 h de cultivo

Analisamos a concentração de Mg^{2+} intracelular nas células cultivadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} . Podemos observar que não houve diferença na concentração intracelular desse mineral nas condições analisadas.

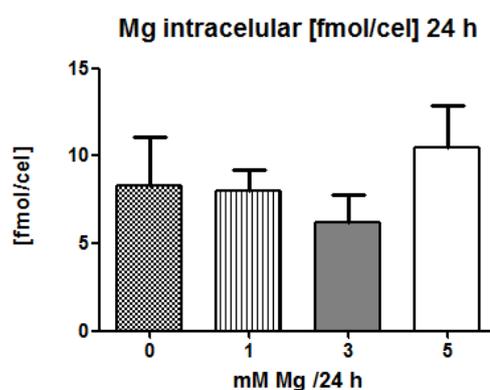


Gráfico 1. Concentração intracelular de Mg^{2+} . Resultados expressos em média \pm erro padrão, representativo de 3 ensaios independentes.

6.2 Expressão do canal TRPM7 nas células C3H/10T1/2

Observamos por imunofluorescência que a marcação foi positiva para TRPM7 nas células C3H/10T1/2 independente da concentração desse mineral no meio de cultura (figura 3 A-E).

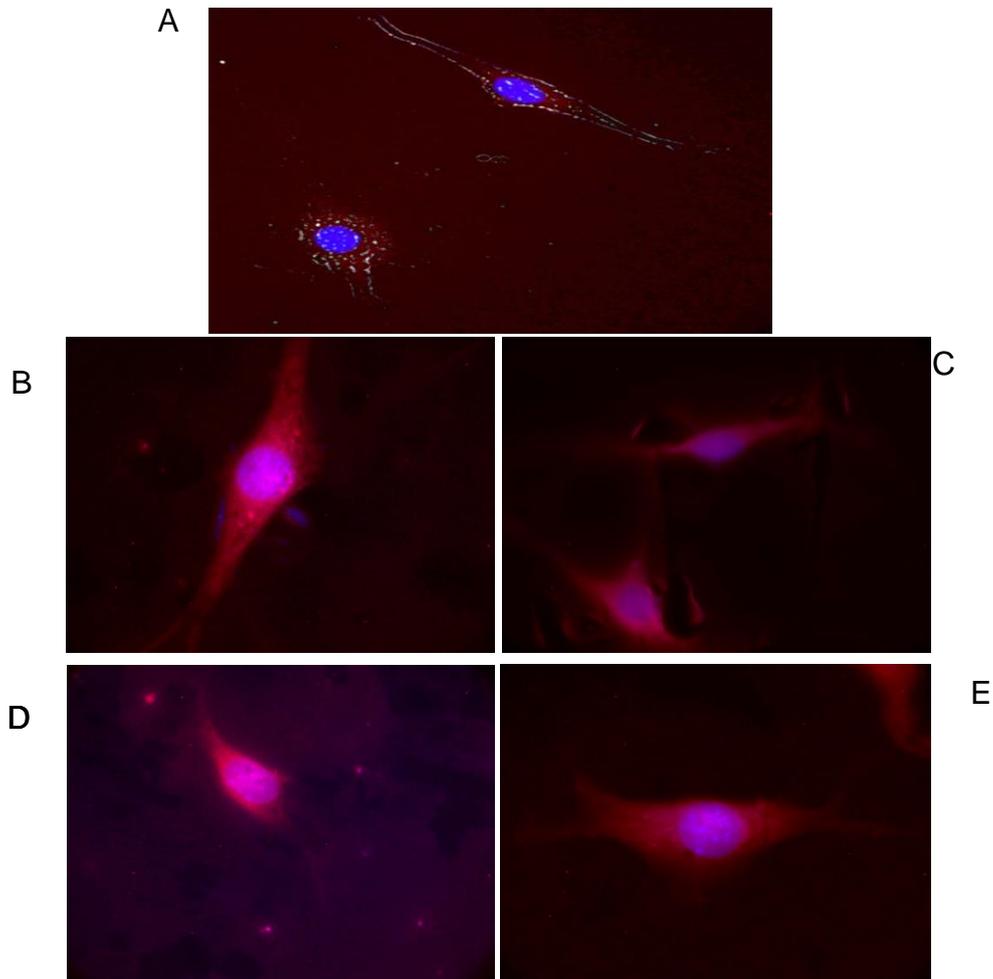


Figura 3. Representação da expressão do canal TRPM7 por imunofluorescência marcada com DAPI nas células C3H/10T1/2, demonstrados em A (sobreposição das duas imagens - MERGE), B (0 mM Mg^{2+} / L), C (1 mM Mg^{2+} / L), D (3 mM Mg^{2+} / L) e E (5 mM Mg^{2+}).

A análise de TRPM7 por citometria de fluxo mostrou que não houve diferença, tanto na porcentagem de células marcadas para esse canal, como na média da intensidade de fluorescência independente da concentração de Mg^{2+} (Figura 4 A e B).

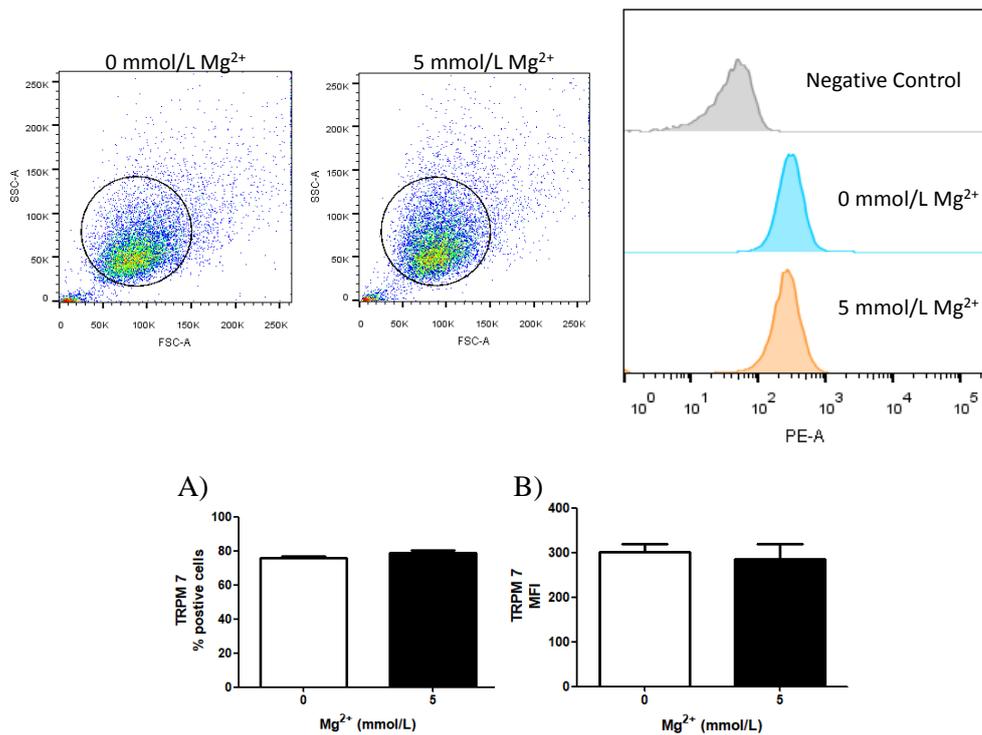


Figura 4. Expressão de TRPM7. Porcentagem de células C3H/10T1/2 marcadas para TRPM7 (A) e média da intensidade de fluorescência (MFI). Resultados expressos em média \pm erro padrão.

6.2 Análise da viabilidade de células C3H/10T1/2 cultivadas com diferentes concentrações de Mg²⁺ por MTT

Avaliamos a proliferação relativa das células submetidas a cultivo com diferentes concentrações de Mg²⁺ por 24 h sem estímulo, com LPS (lipolissacarídeo) e TNF- α , pelo ensaio de MTT. Observamos que o tratamento com Mg²⁺ foi capaz de aumentar a proliferação relativa dessas células independente do tipo de estímulo.

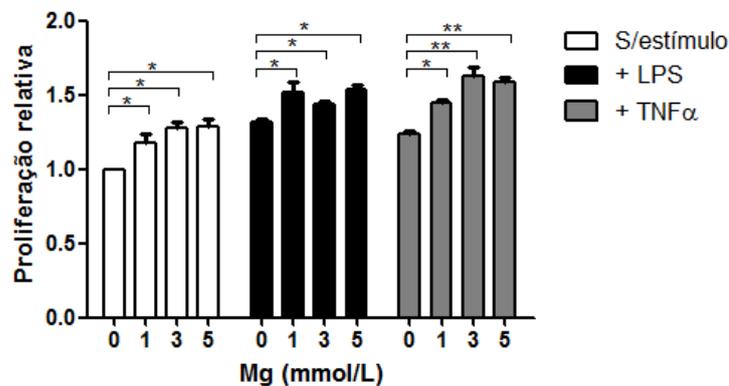


Gráfico 2. Análise da viabilidade das células C3H/10T1/2 por MTT, cultivadas com diferentes concentrações de Mg²⁺. Resultados expressos em média \pm erro padrão, representativo de 6 ensaios independentes (*p < 0,05; **p < 0,01).

6.3 Análise da viabilidade, apoptose e necrose nas células C3H/10T1/2 cultivadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} por citometria de fluxo

Após tratamento por 24 h com 0, 1, 3 e 5 mM Mg^{2+} , as células receberam ou não estímulo com LPS ou $TNF-\alpha$ e a viabilidade, apoptose e necrose foram analisadas por citometria de fluxo. Observamos que o tratamento das células com diferentes concentrações de Mg^{2+} e estimuladas ou não com LPS e $TNF-\alpha$ não apresentaram diferenças significativas nesses parâmetros nas condições avaliadas (Gráfico 3).

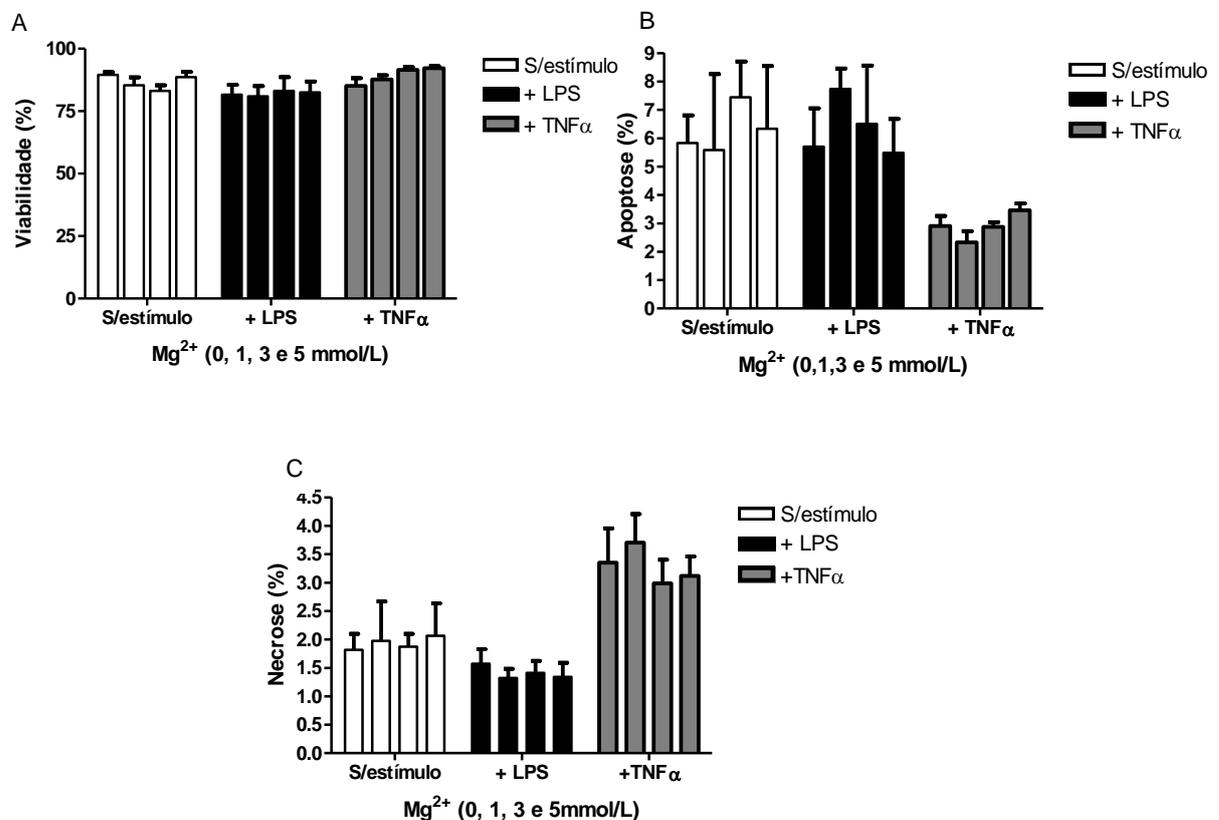


Gráfico 3. Avaliação da viabilidade relativa (A), apoptose (B) e necrose (C) das células C3H/10T1/2 por citometria de fluxo. O gráfico representa a média \pm erro padrão de 6 ensaios independentes.

6.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Avaliamos nas células C3H10T1/2 o ciclo celular por citometria de fluxo, e observamos que as células tratadas com magnésio (0,1,3 e 5 mM Mg^{2+} /L) apresentaram menor porcentagem de células na fase G0/G1 e aumento na fase S/G2/M quanto maior a concentração desse mineral. Analisamos também o ciclo

celular nas células C3H10T1/2 desafiadas com 1,25 ug / mL de LPS e 1,0 ng / mL de TNF, e tratadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} . Podemos observar o mesmo padrão de resposta celular ao ciclo, ou seja, células tratadas com maiores concentrações de Mg^{2+} apresentaram maior porcentagem de células da fase S/G2/M e menor na fase G0/G1 do ciclo celular (gráfico 4).

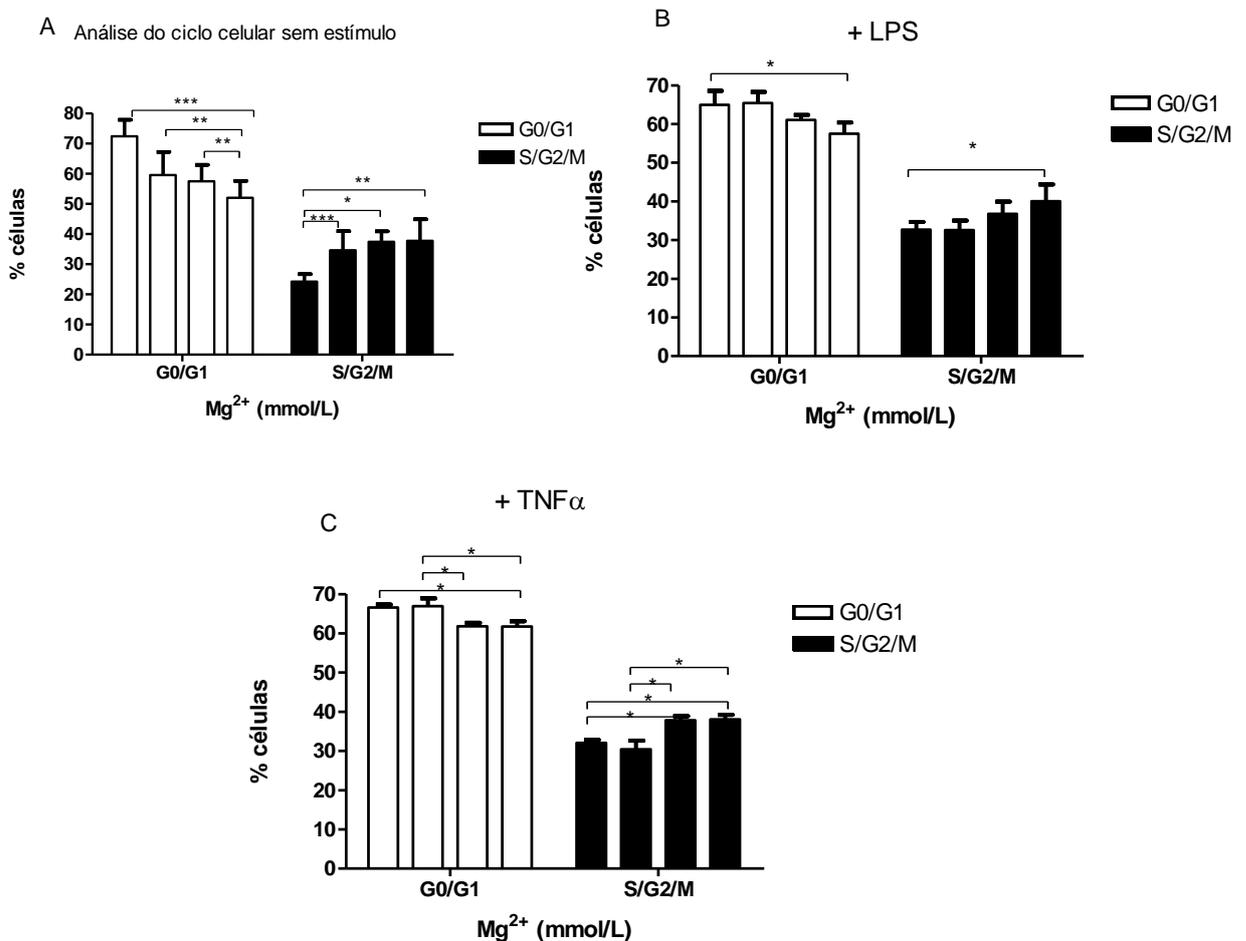


Gráfico 4. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo nas células C3H/10T1/2 sem estímulo (A), estimuladas com LPS (B) e TNF- α (C). O gráfico representa a média \pm erro padrão de 8 ensaios independentes (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$).

6.5 Avaliação da produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e PGE2 no sobrenadante das células C3H/10T1/2 tratadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} e estimuladas com LPS ou TNF- α

Observamos que o tratamento com diferentes concentrações de Mg^{2+} sem estímulo adicional durante 24 h não levou a alterações na produção de IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β e PGE2 nas condições avaliadas. Porém, quando essas células receberam LPS (1,25 ug / mL) por 2 horas, a concentração de IL-1 β foi menor naquelas culturas que receberam 1, 3 e 5 mM Mg^{2+} . Quando as células receberam

TNF- α , a diminuição da produção dessa citocina foi menor apenas nas culturas enriquecidas com as maiores concentrações desse mineral (3 e 5 mM Mg²⁺).

Nos cultivos que foram estimulados com LPS, a concentração de IL-6 apresentou resultados similares à IL-1 β , com diminuição da produção de IL-6 nos meios suplementados com Mg²⁺. Quando as culturas foram desafiadas com TNF- α , a concentração de IL-6 foi menor nas células que receberam 1, 3 e 5 mM Mg²⁺ (gráfico 5 A e B).

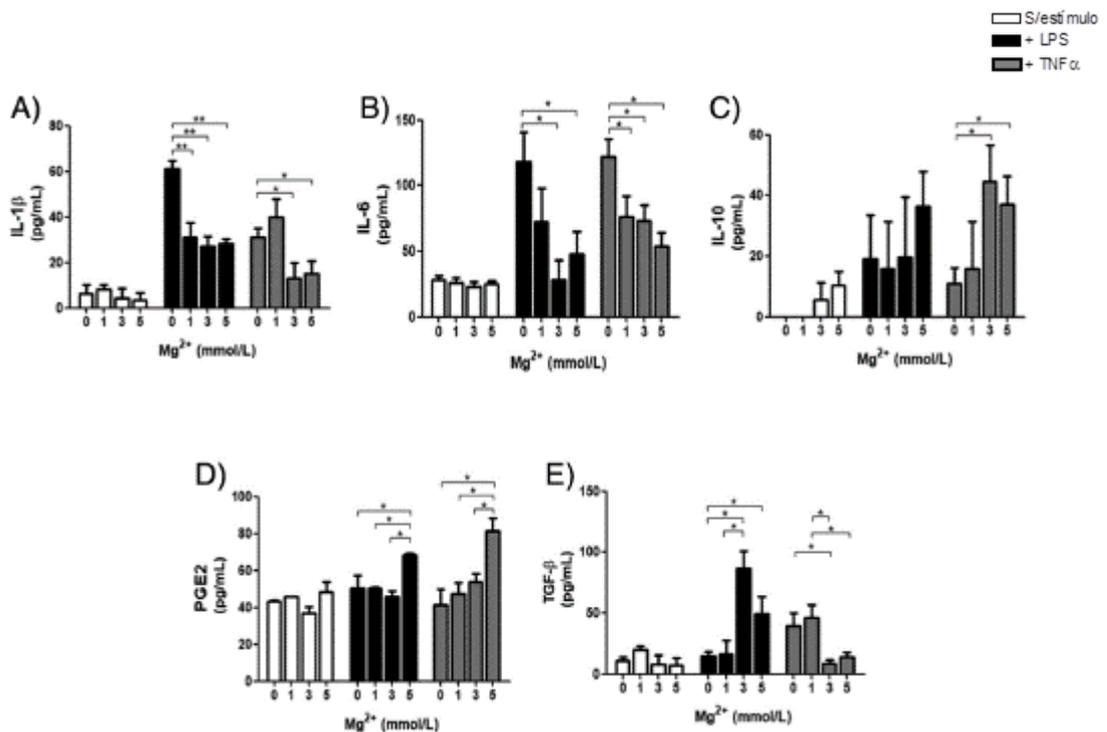


Gráfico 5 . Determinação de IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e PGE2 no sobrenadante das células C3H/10T1/2 após cultura de 24 h com diferentes concentrações de Mg²⁺, sem estímulo ou desafiadas com LPS ou TNF- α por 2 h. O gráfico representa a média \pm erro padrão de 3 ensaios independentes. (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01).

Quanto a determinação da concentração da IL-10, os resultados mostram maior concentração dessa citocina no sobrenadante dos meios que receberam 3 e 5 mM de Mg²⁺ estimulados com TNF- α (gráfico 5 C). Em relação ao TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) verificamos que sua concentração foi menor no sobrenadante das células tratadas com 3 e 5 mM de Mg²⁺ com TNF- α , e maior nessas mesmas concentrações desse mineral quando estimuladas com LPS (gráfico 5 D). A concentração de PGE2 foi maior no sobrenadante das células tratadas com 5 mM de Mg²⁺ independente do tipo de estímulo (gráfico 5E).

6.8 Análise da produção de óxido nítrico nas células C3H10T1/2

Na análise da produção de óxido nítrico, os resultados apresentados mostram que não houve diferença na concentração desse composto nas condições avaliadas (gráfico 6).

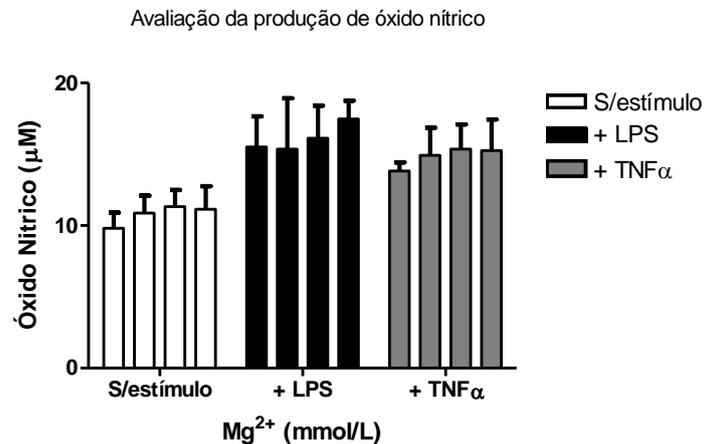


Gráfico 6. Produção de óxido nítrico nas células C3H10T1/2 cultivadas com 0, 1, 3 e 5 mM Mg^{2+} por 24 h sem estímulo ou estimuladas por 2 h com LPS ou TNF- α . O gráfico representa a média \pm erro padrão de 6 ensaios independentes.

6.6 Avaliação da expressão de pNF κ B / NF κ B e pSTAT3/STAT3

Avaliamos por Western Blot o efeito do tratamento com Mg^{2+} nas células C3H/10T1/2, sobre a expressão das proteínas NF κ B e STAT3 tanto da porção total como da fosforilada (gráfico 6 A e B). Identificamos que as células tratadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} e desafiadas com LPS ou TNF- α apresentaram menor relação p NF κ B / NF κ B em ambos tratamentos (gráfico 7-A).

Análise da expressão de pNFκB / NFκB e pSTAT3/STAT3

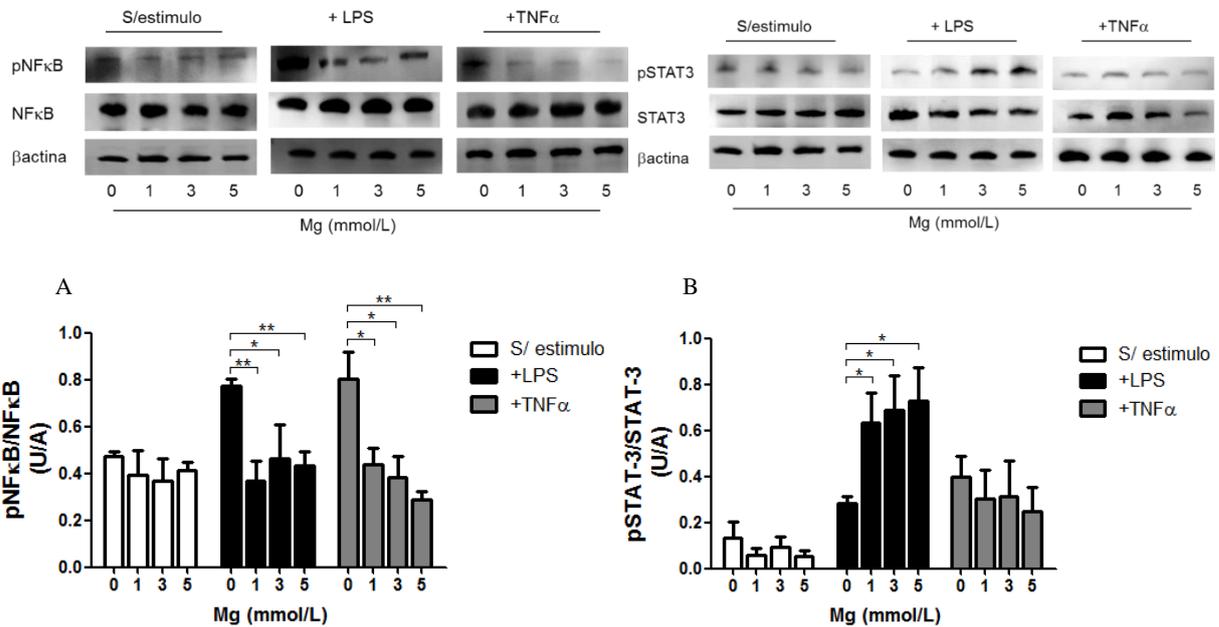


Gráfico 7. Expressão de (A) pNFκB/NFκB e (B) pSTAT3/STAT3 nas células C3H/10T1/2 tratadas com diferentes concentrações de Mg²⁺ e estimuladas ou não com LPS ou TNF-α. A razão entre a porção fosforilada e a total é representada pela média ± erro padrão de 3 ensaios independentes. (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

Sobre a expressão de STAT3 total e fosforilado nas células C3H/10T1/2 cultivadas com diferentes concentrações de Mg²⁺ sem estímulo, com LPS ou TNF-α observamos que aquelas células tratadas com diferentes concentrações de Mg²⁺ e estimuladas com LPS a razão pSTAT-3/STAT3 foi maior quanto maior a concentração desse mineral (gráfico 7-B).

Após as avaliações nas células C3H/10T1/2 do efeito do enriquecimento com Mg²⁺, coletamos o sobrenadante dessas células tratadas com diferentes concentrações desse mineral e estimuladas ou não com LPS e TNF-α. A esse meio coletado, denominamos de 'meio condicionado'. Os ensaios apresentados a seguir buscaram investigar os efeitos do 'meio condicionado' em uma célula de linhagem tipo macrófagos (RAW 264.7), e linfócitos primários provenientes do baço de camundongos C57Bl/6, a fim de se investigar se o tratamento da célula C3H/10T1/2

com Mg^{2+} é capaz de alterar alguns aspectos relacionados à produção de citocinas e a viabilidade de células fundamentais para a resposta imune.

6.9 Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 e em linfócitos por MTT cultivadas com ‘meio condicionado’ por 24 h

No ensaio de MTT realizado nas células RAW 264.7 e em linfócitos primários tratados com ‘meio condicionado’ provenientes de células C3H10T1/2 cultivados com 0 e 5 mM Mg^{2+} e estimuladas com LPS ou $TNF-\alpha$ (gráfico 8 A e B), observamos menor viabilidade nas células tratadas com os meios condicionados comparadas ao seu controle (‘meio não condicionado’).

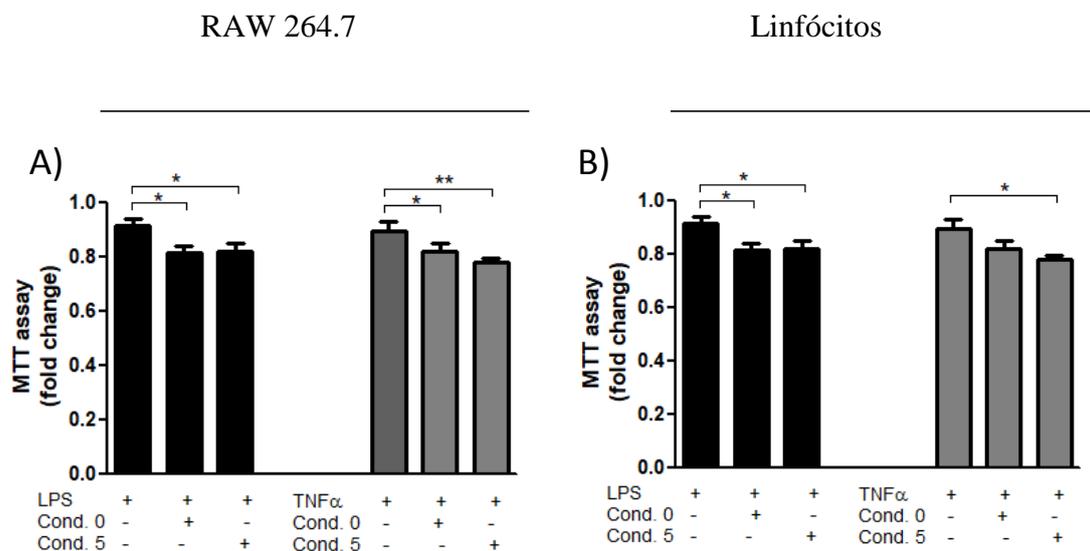


Gráfico 8. Avaliação da viabilidade celular por MTT nas células RAW 264.7 (A) e linfócitos (B) cultivados com ‘meios condicionados’ por 24 h. O gráfico representa a média da absorbância \pm erro padrão de 6 ensaios independentes. (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01).

6.10 Determinação de IL-1 β , IL-6, $TNF-\alpha$ e IL-10 nas células RAW 264.7 cultivadas com ‘meio condicionado’.

Na tentativa de esclarecer se os ‘meios condicionados’ das células C3H10T1/2 exercem algum papel na produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias por outras células imunes, avaliamos, nas células de linhagem RAW 264.7 as citocinas IL-1 β , IL-6, $TNF-\alpha$ e IL-10 nos meios controles ou ‘meios condicionados’ por 24 h. Na análise da concentração de IL-1 β , observamos que as células cultivadas com ‘meios condicionados’ e desafiadas com LPS apresentaram

diminuição significativa da produção dessa citocina quando estimuladas com LPS. Quando essas células foram estimuladas com TNF α houve menor concentração de IL1- β nas células cultivadas com ‘meio condicionado’, e maior concentração dessa citocina no meio sem Mg $^{2+}$ (gráfico 9 A).

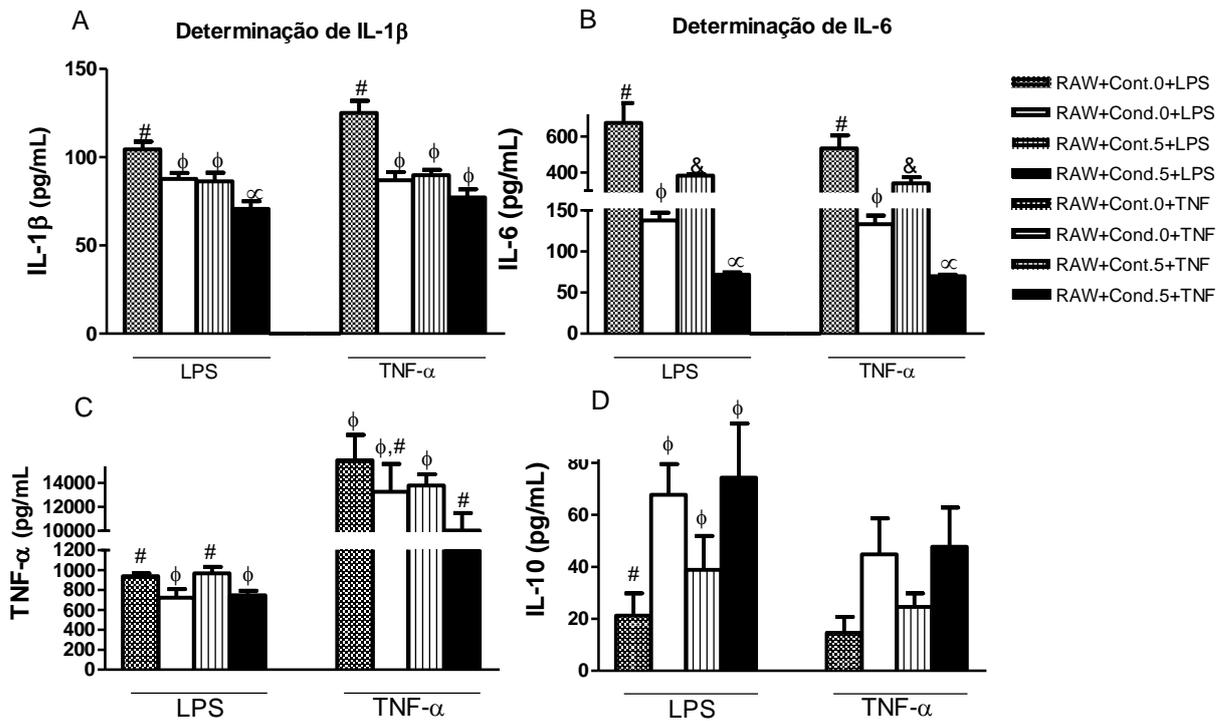


Gráfico 9. Determinação de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α e IL-10 no sobrenadante das células RAW 264.7 após cultura por 24 h com meios controles e ‘condicionados’, desafiadas com LPS ou TNF- α . O gráfico representa a média \pm erro padrão de 6 ensaios independentes.

Em relação a IL-6 observamos que as células RAW 264.7 cultivadas com ‘meio condicionado’ independente do estímulo apresentaram diminuição da produção de IL-6 quando comparadas aos seus respectivos controles (gráfico 9B). Quanto à concentração de TNF α , podemos observar diminuição da concentração dessa citocina no sobrenadante das células cultivadas com ‘meio condicionado’ comparado ao seu respectivo controle, independente da concentração de Mg $^{2+}$ e tipo de estímulo (gráfico 9C). A concentração de IL10 (gráfico 9D) foi maior no sobrenadante das células cultivadas com os ‘meios condicionados’ quando estimuladas com LPS comparados aos seus respectivos controles, independente da concentração de Mg $^{2+}$.

6.11 Determinação de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 em linfócitos primários cultivados com 'meio condicionado'

Sabemos que o Mg^{2+} tem propriedade anti-inflamatória e que a célula mesenquimal, uma vez estimulada, pode desencadear em diferentes células imunes, entre elas linfócitos, um fenótipo imunossupressor. Nesse contexto, investigamos a capacidade do 'meio condicionado' em modular a produção de algumas citocinas produzidas pelas células linfóides primárias obtidos do baço de camundongos C57BL/6. Verificamos que, enquanto a produção de IFN- γ não apresentou nenhuma diferença na sua produção após o tratamento (gráfico 10 A), a citocina IL-17 apresentou aumento da concentração nas células tratadas com 'meios condicionados' e desafiadas com LPS (gráfico 10 B). Em relação à concentração de IL-4 nas células estimuladas com LPS, o 'meio condicionado' com 5 mM Mg^{2+} apresentou diminuição na concentração dessa citocina comparado ao seu controle. Não houve diferença significativa quando as células foram estimuladas com TNF- α (gráfico 10 C).

A Interleucina-10 é uma das principais citocinas que apresenta papel anti-inflamatório, e sua determinação é muito utilizada para avaliar o efeito de uma resposta imunossupressora ou de controle da inflamação. Nós avaliamos a concentração de IL-10 nas células linfóides do baço tratadas com o 'meio condicionado', para verificar se o Mg^{2+} , na concentração de 5 mM, poderia agir de forma sinérgica com o fenótipo imunossupressor da célula C3H10T1/2. Observamos aumento da concentração de IL-10 no sobrenadante das células que receberam o meio condicionado e estimuladas com LPS comparados ao controle, e o mesmo padrão de resposta quando as células receberam TNF- α (gráfico 10 D).

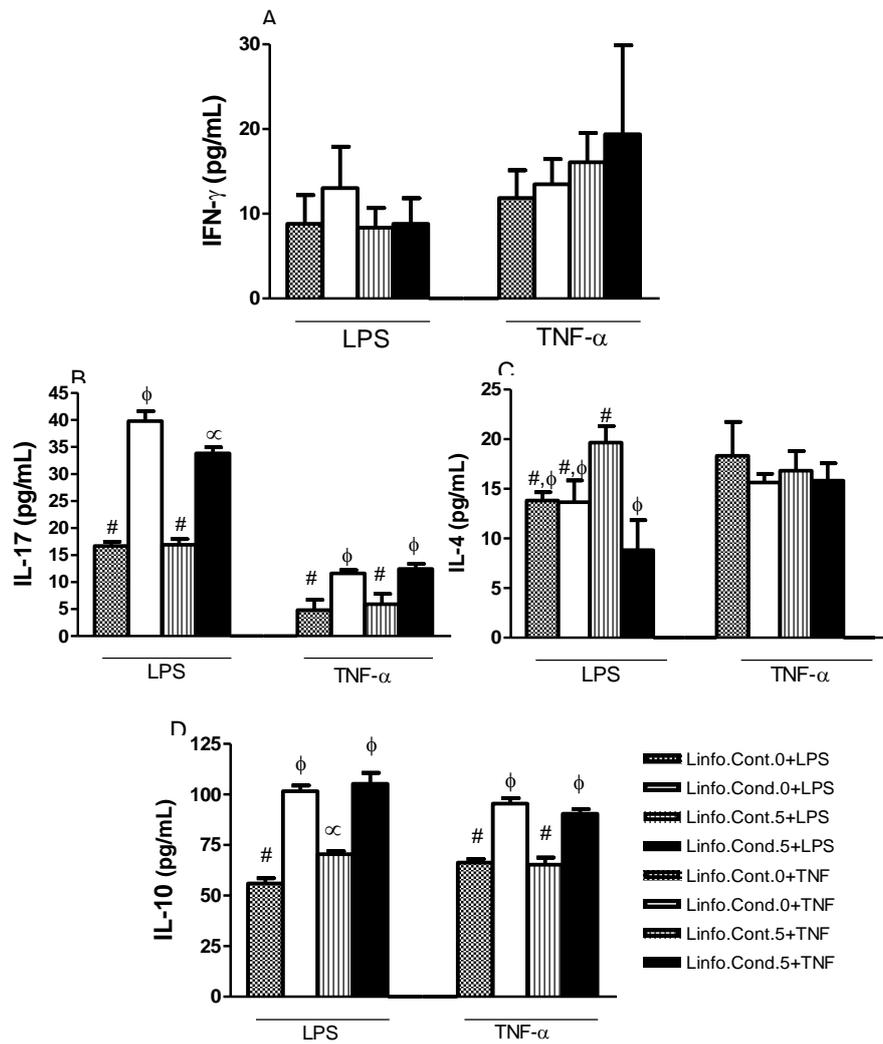


Gráfico 10. Determinação de IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) no sobrenadante de linfócitos após cultura por 24 h com meios controles e 'condicionados', desafiadas com LPS ou TNF- α . O gráfico representa a média \pm erro padrão de 6 ensaios independentes.

Capítulo 2

Modelo Animal

6.11 Análise do peso, consumo de ração e água

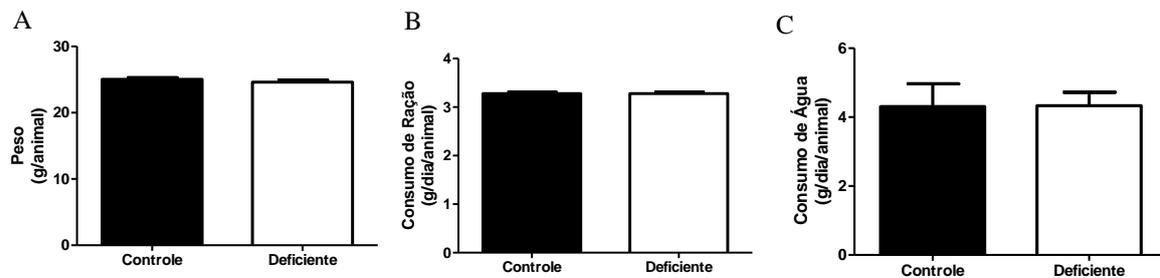


Gráfico 11. Peso corporal dos animais (A), consumo de ração (B) e água (C) dos grupos controle e deficiente em Mg^{2+} por 4 semanas. Os resultados representam a média \pm erro padrão.

Durante o período experimental foi avaliado semanalmente o peso corporal, consumo de ração e água dos camundongos submetidos a dieta controle e a dieta com restrição de 90 % de Mg^{2+} (deficiente) por 4 semanas. Os dados apresentados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos.

6.12 Análise do perfil bioquímico, inflamatório e hematológico

Na análise do perfil bioquímico observamos que a concentração de Mg^{2+} foi menor no grupo que recebeu a dieta restrita nesse mineral. A concentração de cálcio sérico apresentou-se maior no grupo que recebeu a dieta restrita em Mg^{2+} . Não houve diferença significativa entre os grupos na concentração de proteína, albumina, pré-albumina e nos marcadores inflamatórios (Tabela 6).

Tabela 4. Avaliação dos parâmetros séricos e do sangue periférico dos animais controles e deficientes em Mg²⁺

	Controle	Deficiente
<i>Parâmetro sérico</i>	(n = 12)	(n = 12)
Proteína total (g/dL)	4.90 ± 0.05	4.88 ± 0.06
Albumina (g/dL)	3.36 ± 0.04	3.41 ± 0.04
Pré-albumina (mg/dL)	11.43 ± 0.71	12.14 ± 0.34
Magnésio (mg/dL)	2.88 ± 0.06	2.10 ± 0.11***
Calcio (mg/dL)	8.20 ± 0.11	8.90 ± 0.12**
PCR (ng/mL)	855.8 ± 63.3	919.3 ± 58.7
TNF-α sérico (pg/mL)	12.27 ± 6.69	13.38 ± 7.72
<i>Sangue periférico</i>	(n = 12)	(n = 12)
Eritrocitos (10 ⁶ /mm ³)	7.05 ± 0.24	6.91 ± 0.21
Hemoglobina (g/dL)	11.03 ± 0.63	10.95 ± 0.75
Hematócrito (%)	32.17 ± 2.03	32.35 ± 2.30
Leucócitos totais (/mm ³)	1305.0 ± 211.3	1593.0 ± 133.8
Neutrófilos (/mm ³)	166.6 ± 44.97	659.0 ± 54.96****
Eosinófilos (/mm ³)	53.8 ± 10.30	61.0 ± 11.72
Linfócitos (/mm ³)	1071.0 ± 165.20	868.3 ± 96.64
Monócitos (/mm ³)	13.60 ± 8.70	4.33 ± 3.02
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	570.0 ± 55.21	615.5 ± 37.15

Resultados das análises dos parâmetros séricos bioquímicos e inflamatórios e dos parâmetros do sangue periférico dos animais controle e deficiente em Mg²⁺, representados pela média ± erro padrão. ** (p ≤ 0.01), *** (p ≤ 0.001), **** (p ≤ 0.0001).

A análise do perfil hematológico mostrou maior número de neutrófilos no sangue periférico dos animais do grupo deficiente em Mg²⁺ comparado com o grupo controle. Demais parâmetros não apresentaram diferença significativa.

6.13 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Avaliamos nas células totais da medula óssea o ciclo celular por citometria de fluxo, e observamos que as células dos animais do grupo deficiente apresentaram maior porcentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular (gráfico 12 A).

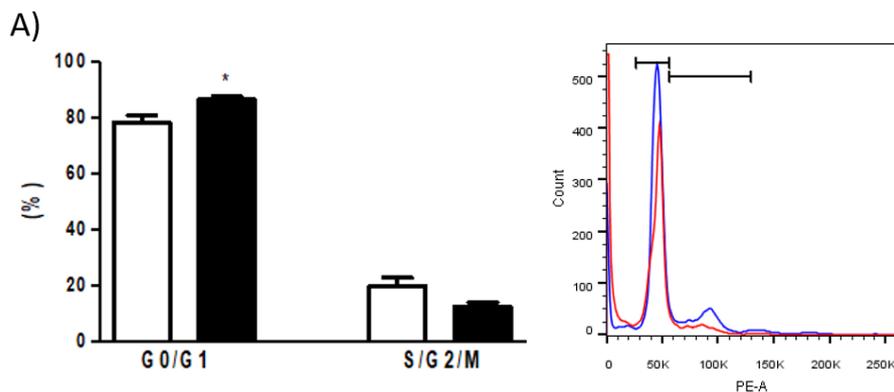


Gráfico 12. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo nas células totais da medula óssea dos animais do grupo controle e deficiente em Mg^{2+} . O gráfico representa a média \pm erro padrão.

6.13 Contagem das células da medula óssea e mielograma

Não foram observadas diferenças entre os grupos na contagem das células totais da medula óssea. Na contagem diferencial, houve aumento significativo na contagem de blastos, granulócitos jovens e em anel no grupo que recebeu a dieta deficiente em Mg^{2+} comparado ao grupo controle (Gráfico 13 A-I).

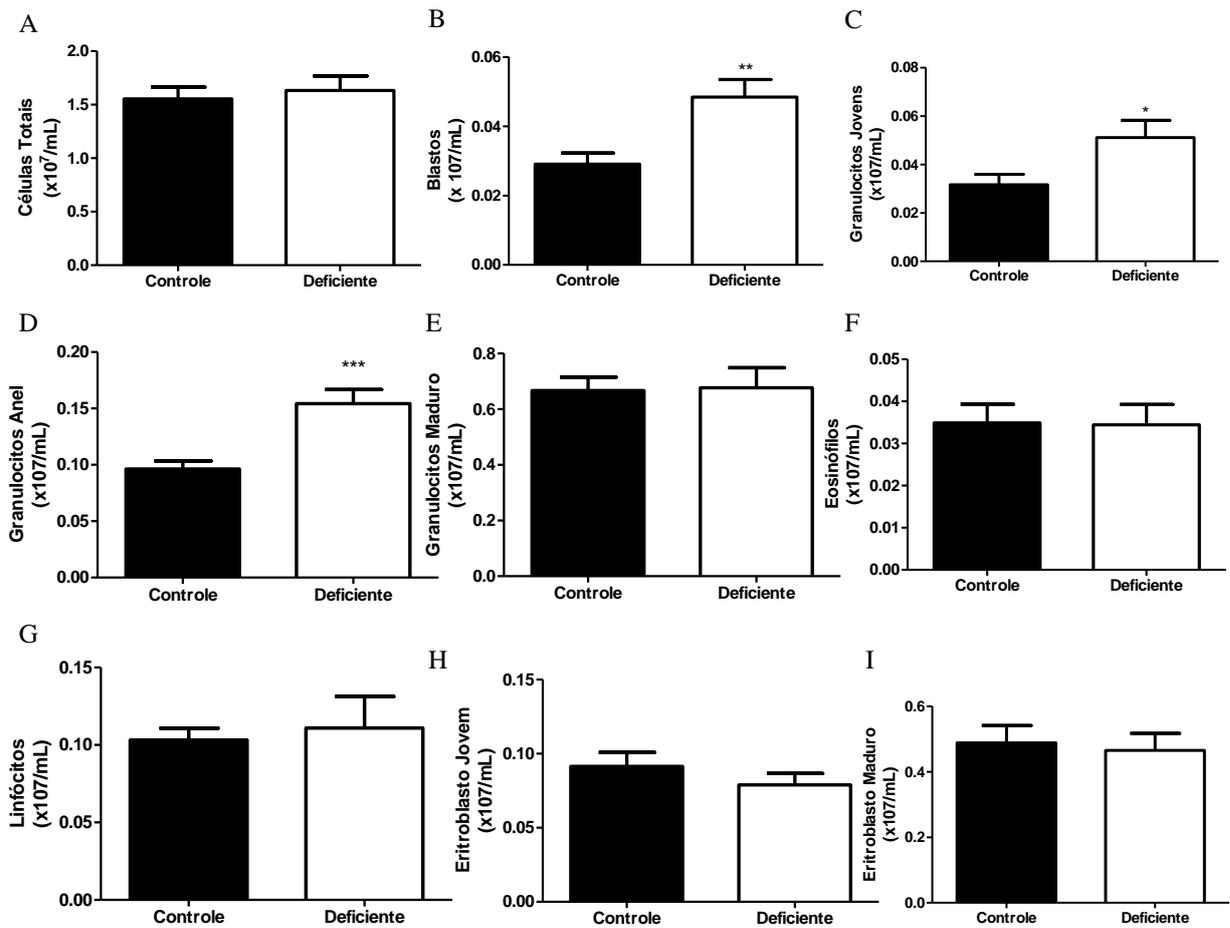


Gráfico 13. Contagem total das células da medula óssea e mielograma dos camundongos submetidos à dieta controle e deficiente em Mg^{2+} por 4 semanas, representados pela média \pm erro padrão (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $(p \leq 0.001)$).

6.14 Imunofenotipagem da medula óssea

Avaliamos a caracterização imunofenotípica das células da medula óssea dos animais do grupo controle e deficiente em Mg^{2+} . As células foram marcadas para HSC (célula tronco hematopoiética), HP (progenitor hematopoiético), CMP (progenitor mielóide comum), GMP (progenitor granulócitos/monócitos), MEP (progenitor megacariocítico), CLP (progenitor linfóide comum), granulócitos, monócitos, LB (linfócitos B), $CD3^+$ (células T) e NK (células *Natural Killer*) (Gráfico 14 A-L).

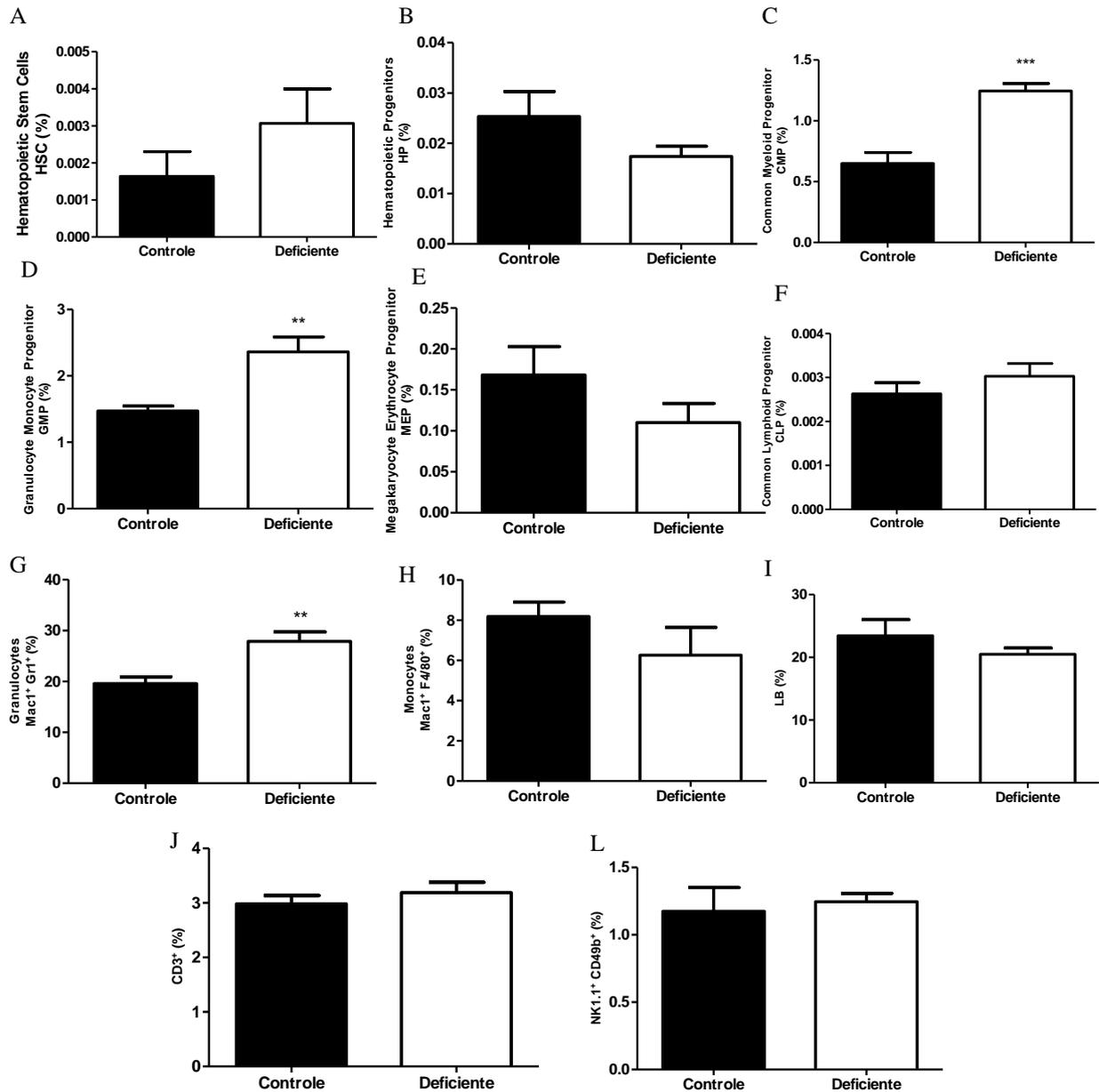


Gráfico 14. Imunofenotipagem das células da medula óssea dos camundongos submetidos à dieta controle e deficiente em Mg^{2+} por 4 semanas, representados pela média \pm erro padrão. (** $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Verificamos que houve diferença significativa na porcentagem de células da medula óssea dos animais deficientes em Mg^{2+} marcadas para CMP, GMP e granulócitos maduros comparados ao grupo controle, sem alteração nas outras linhagens. A estratégia para análise da imunofenotipagem pode ser observada na Figura 4.

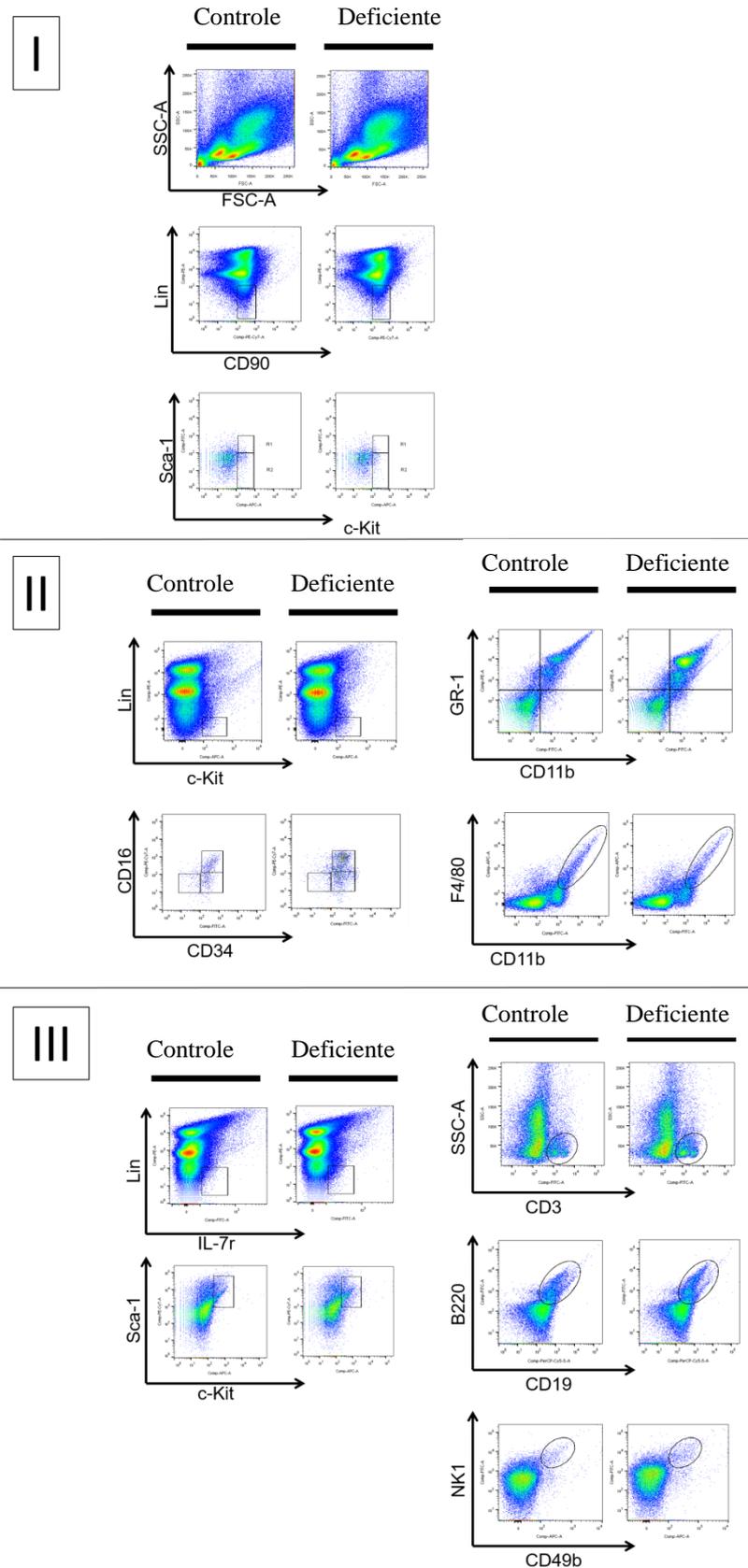


Figura 5. Estratégia de análise da citometria de fluxo. I) Forward Scatter x Side Scatter, $CD90^{+}Lin^{-}$, célula tronco hematopoética (R1) e progenitor hematopoético (R2) estratégia de gate. II) Progenitor mielóide comum, progenitor granulo-monocítico, e progenitor megacariocítico-eritróide – estratégia de gate. Granulócito ($Gr1^{+}/CD11b^{+}$) e mono-macrofágico ($F4/80^{+}/CD11b^{+}$) estratégia de gate. III) Progenitor linfóide comum, células T, B e NK.

6.15 Avaliação da expressão gênica nas células da medula óssea

Investigamos nas células da medula óssea a influência da deficiência de Mg^{2+} sobre a expressão de genes relacionados a diferenciação e proliferação (Gráfico 15 A-L), e observamos maior expressão dos genes CSF-3 e CEBPA, ambos relacionados a diferenciação de granulócitos (Gráfico 15 C e F).

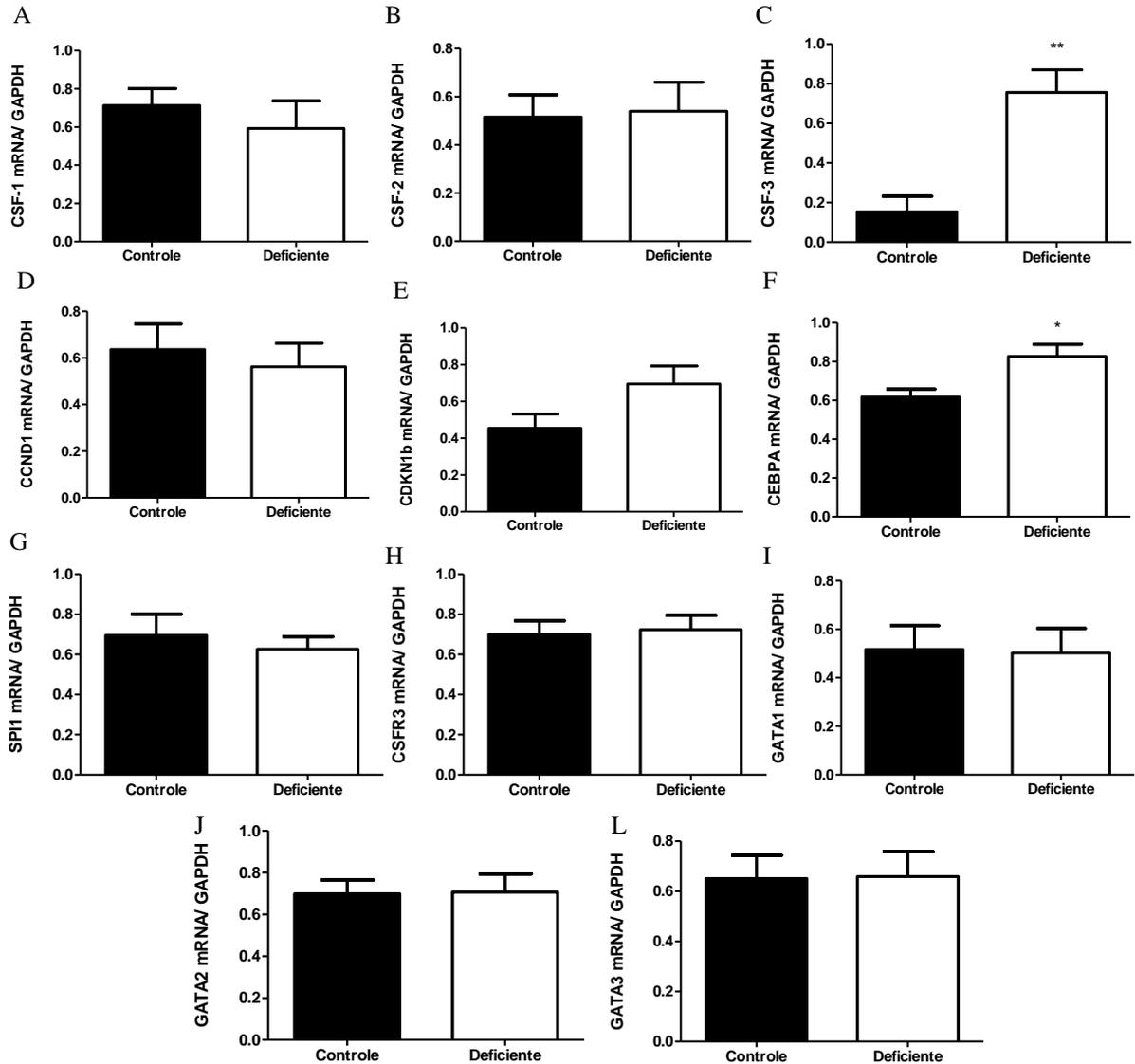


Gráfico 15. Expressão de genes relacionados à diferenciação e proliferação nas células da medula óssea de animais dos grupos controle e deficiente em Mg^{2+} . Valores são relativos à expressão de Gapdh representados pela média \pm erro padrão. (** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$).

6.16 Avaliação da expressão de pSTAT3/STAT3 e PCNA

Avaliamos por Western blot o efeito da deficiência de Mg^{2+} sobre a expressão de pSTAT3/STAT3 e PCNA nas células da medula óssea, e observamos maior expressão da relação pSTAT3/STAT3 nas células da medula óssea dos animais do grupo deficiente comparados ao grupo controle, enquanto que não houve diferença na expressão de PCNA (Gráfico 16 A-B).

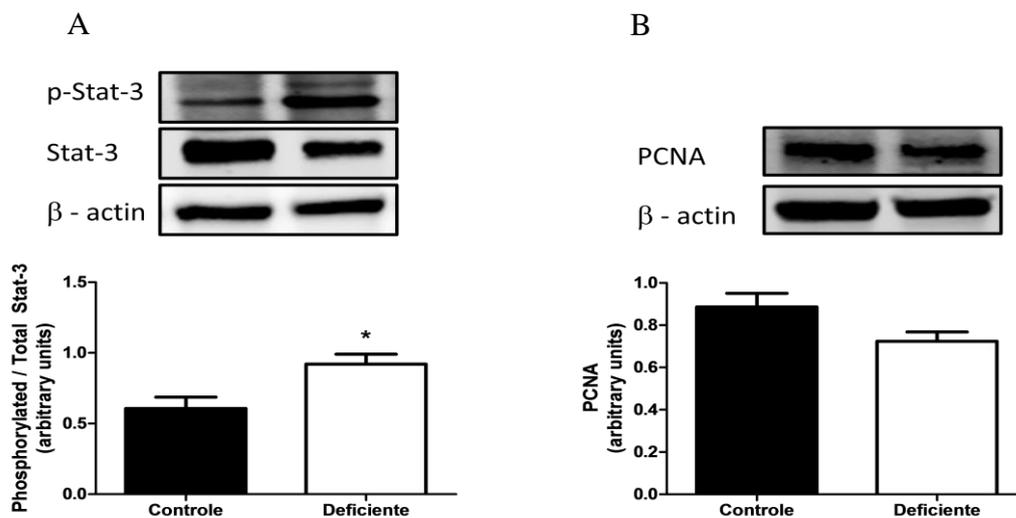


Gráfico 16. Expressão e quantificação de (A) pSTAT3/STAT3 e (B) PCNA nas células da medula óssea de animais controle e deficiente em Mg^{2+} . A razão entre a porção fosforilada e a total é representada pela média \pm erro padrão. (* $p \leq 0,05$).

6.17 Determinação da concentração de G-CSF e IL-6

Avaliamos as citocinas que podem influenciar a diferenciação de granulócitos na medula óssea e observamos aumento da concentração de G-CSF no lavado da medula óssea dos animais do grupo deficiente Mg^{2+} comparado ao grupo controle, sem diferença significativa na concentração de IL-6 (Gráfico 17 A-B).

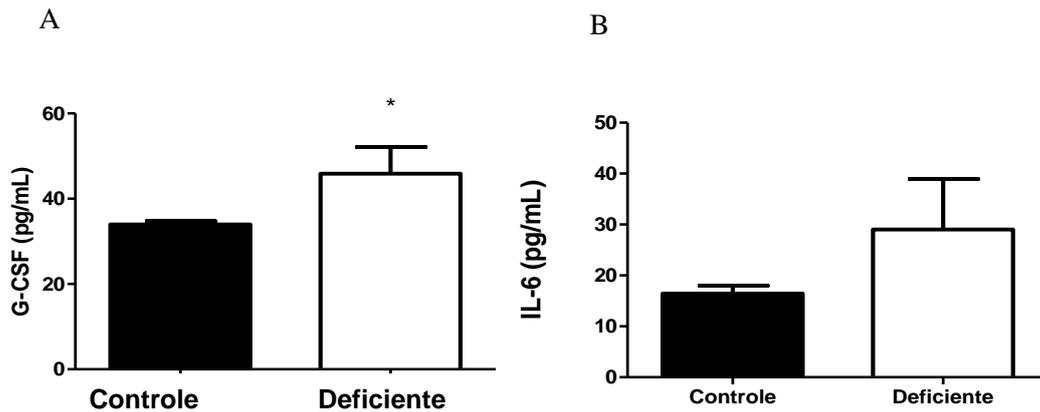


Gráfico 17. Concentração de G-CSF (A) e IL-6 (B) no lavado da medula óssea de animais do grupo controle e deficiente em Mg^{2+} . O gráfico representa a média \pm erro padrão. (* $p \leq 0,05$).

6.18 Análise de unidade formadora de colônia

Avaliamos a formação de colônias granulocíticas (CFU-G) nas células mononucleares da medula óssea dos animais controles e deficientes em Mg^{2+} . A formação de colônias foi avaliada em meio de cultura controle (concentração padrão de Mg^{2+}) e em meio de cultivo sem Mg^{2+} . Observamos maior formação de CFU-G nas células dos animais deficientes em Mg^{2+} comparados ao grupo controle, quando as células foram cultivadas em meio padrão para a concentração de Mg^{2+} , entretanto essa diferença não foi significativa. Porém, quando cultivamos as células dos animais do grupo deficiente em meio deficiente em Mg^{2+} observamos aumento significativo da formação de CFU-G (Gráfico 17).

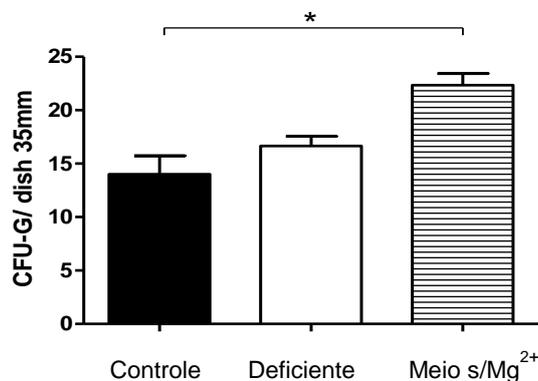


Gráfico 18. Avaliação da formação de CFU-G nas células da medula óssea do grupo controle e deficiente em Mg^{2+} em meios de cultura controle e sem Mg^{2+} em ensaio de metilcelulose. O gráfico representa a quantidade de colônias formadas após o período de indução da sua formação. Resultados expressos em média \pm erro padrão.

7. DISCUSSÃO

Capítulo 1:

O Mg^{2+} é cofator em centenas de reações enzimáticas, é um mineral indispensável para a célula, disponível no compartimento intracelular principalmente na forma do complexo MgATP, participando de reações geradoras de energia, bem como da síntese de ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, está envolvido no metabolismo da glicose, na regulação do tônus vascular e função endotelial, dentre outros (JAHNEN-DECHENT & KETTELER, 2012). Portanto, é razoável inferir que alteração no conteúdo desse mineral possa interferir na homeostase celular.

Atualmente, não há um consenso sobre os benefícios da suplementação com Mg^{2+} sobre as células imunes e os resultados são controversos. Por um lado, alguns estudos têm demonstrado que em diversas condições de saúde, a suplementação com esse mineral pode ser imunologicamente benéfica, e que o Mg^{2+} parece ter efeito anti-inflamatório, atuando na diminuição da concentração da PCR, TNF- α e IL-6 (ALMOZNINO-SARAFIAN et al., 2007; SUGIMOTO et al., 2012). Por outro lado, estudos mostram que a suplementação com esse mineral parece não exercer nenhum efeito sobre esses mesmos parâmetros inflamatórios (SIMENTAL-MENDIÀ et al., 2012; MOSLEHI et al., 2012).

No contexto imunológico, a célula tronco mesenquimal (CTM) apresenta um importante papel na homeostase do sistema imune, principalmente nos mecanismos relacionados à injúria e reparo à lesão, além de participar na regulação da função de leucócitos. Além disso, essa célula é capaz de secretar diversas moléculas capazes de modular a resposta imune, e na medula óssea trabalha no suporte e sustentação do microambiente hematopoético (SHI et al., 2012; PONTIKOGLU et al., 2011).

Muito se têm discutido acerca da influência do Mg^{2+} na proliferação e diferenciação da CTM, principalmente sobre os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação em osteoblastos. Porém, o papel do Mg^{2+} em influenciar alguns aspectos da capacidade imunomoduladora da CTM não está totalmente claro na literatura, e até o momento é assunto pouco explorado.

Nesse trabalho, optamos por estabelecer um modelo *in vitro* com a célula de linhagem C3H/10T1/2, como modelo para CTM para investigar: i) a influência do Mg^{2+} sobre a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias e suas vias

relacionadas, e explorar se esse mineral pode influenciar na proliferação, ciclo celular e apoptose dessa célula cultivada com diferentes concentrações de Mg^{2+} e ii) a influência do Mg^{2+} sobre a capacidade imunorreguladora da CTM sobre outras células imunes.

I) A linhagem C3H/10T1/2 clone 8 (ATCC® CCL-226™ Manassas, VA, USA) foi estabelecida em 1972, derivada do tecido embrionário da linhagem de camundongo C3H (*mus musculus*), sem registro de transformação espontânea *in vitro* (REZNIKOFF et al., 1973). Essa linhagem celular apresenta morfologia tipo fibroblastóide, aderente, e de acordo com a literatura, capaz de se diferenciar sob fatores indutivos em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (TANG et al., 2004; ZHAO et al., 2009).

A análise da concentração de Mg^{2+} nos sobrenadantes das células C3H/10T1/2 apresentou redução do conteúdo de Mg^{2+} extracelular. Na análise de Mg^{2+} intracelular, foi possível observar que não houve diferença significativa ou aumento do conteúdo intracelular de Mg^{2+} total mesmo quando cultivadas sem Mg^{2+} . Nesse contexto, Suzuki-Kakisaka e cols (2013) avaliaram em células THP-1 cultivadas com 2.5 mM $MgSO_4$ a concentração intracelular de Mg^{2+} , e verificaram aumento do conteúdo intracelular desse mineral. Nesse sentido, é possível que a diferença nos dados obtidos possa ser devido aos diferentes tipos celulares estudados (THP-1 x C3H/10T1/2) e tempo de cultivo (100 min x 24 h). Além disso, é possível que a diminuição da concentração de Mg^{2+} extracelular sem aumento do conteúdo intracelular seja resultado do aumento no potencial proliferativo dessa célula, pois foi observado que as maiores concentrações de Mg^{2+} testadas afetaram positivamente na proliferação da CTM.

Adicionalmente, Krueger et al. (1999), também observaram aumento do potencial proliferativo em células do telencéfalo (embrionárias de galinha), em cultura com 2.5 mM Mg^{2+} / L. Os autores verificaram que o aumento do Mg^{2+} extracelular resultou em maior viabilidade (51 %) e maior taxa proliferação celular (25 %). Wolf & Cittadini (1999) analisaram resultados de pesquisas que relacionaram os efeitos do aumento da concentração extracelular de Mg^{2+} (> 0.8 mM Mg^{2+} / L) e sua relação com a proliferação celular. Os autores concluíram que o aumento do conteúdo extracelular desse mineral pode estimular as sínteses de DNA e protéica, a transcrição de RNA, bem como o metabolismo energético, influenciando positivamente na proliferação celular. Entretanto, nem todos os tipos celulares

apresentam essa mesma relação de aumento da proliferação resultante do aumento no conteúdo de Mg^{2+} . Jia et al. (2016) avaliaram a proliferação de células isoladas do tecido hipocampal de embriões (camundongos C57BL6), cultivadas com diferentes concentrações de Mg^{2+} (0.4, 0.8 ou 1.4 mM), e verificaram menor densidade proliferativa nas células tronco neurais cultivadas com 0.4 e 1.4 mM Mg^{2+} , e maior proliferação e número de mitocôndrias na concentração fisiológica de 0.8 mM desse mineral. Como a mitocôndria desempenha papel em ambos, metabolismo energético e proliferação, os autores concluíram que mudanças na homeostase de Mg^{2+} podem ser capazes de impactar negativamente no metabolismo e na proliferação da célula tronco neural.

A fim de investigar citocinas e vias relacionadas a resposta inflamatória, utilizamos LPS (lipopolissacarídeo) e o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) como agentes estimulatórios. O LPS tem sido muito utilizado na pesquisa no contexto imunológico, dado o seu potencial de amplificar a reação inflamatória e ativar a resposta imune inata. Descoberto há mais de um século, o LPS (componente da membrana externa de bactérias gram-negativas) é composto por lipídio A (constituente básico do LPS), responsável pela atividade de endotoxina e antígeno O (constituído por polissacarídeo de cadeia longa). O TLR4 (Toll-Like receptor 4) e os mediadores envolvidos na sinalização por LPS (CD14, LBP e MD-2), levam a iniciação da cascata de sinais intracelular, que resulta no estímulo à produção de citocinas e resposta inflamatória, eventos muito bem descritos no final da década de 90 (PARK & LEE, 2013; MURDOCK & NÚNEZ, 2016).

O TNF- α é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos / monócitos, relacionada a eventos de sinalização como necrose e apoptose, além de participar na inflamação aguda. A sua relação com a célula mesenquimal tem sido descrito nas últimas décadas, devido ao fato que ambos possuem papel chave no reparo à injúria óssea. Dados da literatura apontam que a injúria do tecido ósseo leva a um estado inflamatório local, com aumento do TNF- α produzido por macrófagos residentes e por células recrutadas ao local da inflamação. O aumento da concentração de TNF- α leva ao aumento da expressão de ICAM1 (molécula de adesão intercelular 1) e VCAM1 (molécula de adesão vascular 1), que são fundamentais para o recrutamento da célula mesenquimal da medula óssea e dos tecidos adjacentes. Ainda, o TNF- α estimula a diferenciação em osteoblastos e condrócitos, ao estimular a secreção de BMP-2 nos osteoblastos residentes,

permitindo que as células mesenquimais precursoras entrem em contato com essa proteína e se diferenciem (KARNES et al., 2015; BAAIJ et al., 2015).

Nós observamos que, independente do estímulo, a proliferação relativa da célula C3H/10T1/2 foi maior em todos os meios enriquecidos com Mg^{2+} . Além disso, observamos que os cultivos que receberam Mg^{2+} apresentaram maior porcentagem de células na fase S/G2/M. A análise do ciclo celular das células que receberam LPS e TNF- α apresentaram resultados similares. Resultados semelhantes para essas concentrações de Mg^{2+} também foram observados por Tennenbaum et al. (1990), que analisaram o ciclo celular de queratinócitos de camundongos recém-nascidos e adultos, e verificaram que o aumento da concentração extracelular desse mineral na concentração de 1 a 5 mM Mg^{2+} / L estimulou a proliferação dessas células, com maior número de células na fase S/G2/M.

Quanto à produção de citocinas, observamos menor concentração das citocinas pró-inflamatórias nas células tratadas com Mg^{2+} , independente do estímulo. Esse resultado, juntamente com a diminuição na razão da fosforilação do NF κ B, indica um efeito da ação anti-inflamatória desse mineral nessas células. Entretanto, se esse efeito é ou não benéfico para a homeostase celular e regulação imune ainda é assunto que deve ser explorado. Isso porque, de acordo com a literatura, a produção de citocinas inflamatórias é necessária para atividade imunossupressora da célula mesenquimal. Quando a concentração de citocinas inflamatórias é insuficiente para estimular a célula mesenquimal a secretar óxido nítrico para exercer seu papel imunossupressor, a função de supressão dessa célula pode ser anulada. Nesse contexto, a produção de IL-6 pela célula mesenquimal tem o papel de inibir a diferenciação de células dendríticas e inibir a proliferação de células T (Ma et al., 2014; GLEN et al., 2014). Ainda, a diminuição de IL-6 pode ser promotora de macrófagos M1 (pró-inflamatório). Assim, CTMs cultivadas com meios enriquecidos com Mg^{2+} que secretam baixas concentrações de IL-6 poderia favorecer macrófagos com fenótipo inflamatório (M1), a diferenciação de células dendríticas e a proliferação de células T e não a supressão desses tipos celulares.

O óxido nítrico faz parte da rede de moléculas importantes para que CTMs exerçam papel imunossupressor. Nossos dados mostraram que não houve diferença na produção de óxido nítrico independente das concentrações de Mg^{2+} e tipos de estímulos. Não foi encontrado até esse momento, nenhum dado na literatura que mostre a influência do Mg^{2+} na produção de óxido nítrico pelas CTMs. O que

sabemos é que a produção de óxido nítrico pode variar dependendo do tipo de cultivo celular empregado, por exemplo, sistema transwell x co-cultura (SATO et al., 2007).

Devido ao potencial anti-inflamatório do Mg^{2+} , investigamos a influência do aumento da concentração desse mineral na concentração de citocinas anti-inflamatórias e observamos aumento da concentração de IL-10 nas concentrações de 3 e 5 mM Mg^{2+} / L quando essas células foram estimuladas com TNF- α . Quando as células foram estimuladas com LPS, não houve diferença na concentração dessa citocina. Mas, de acordo com a literatura, nem sempre o aumento da concentração de Mg^{2+} leva ao aumento da concentração de IL-10. El-Tanbouly e cols (2015) investigaram o efeito da administração de Mg^{2+} (20 e 40 mg / Kg) em camundongos tratados com LPS, e analisaram a PCR (proteína C reativa) e citocinas (TNF- α e IL-10) dentre outros ensaios, e verificaram diminuição da concentração de PCR e TNF- α naqueles animais que receberam LPS e 40 mg / Kg do mineral, porém não houve diferença significativa na concentração de IL-10. Sugimoto et al. (2012) avaliaram o efeito da concentração de 2.5 mM $MgSO_4$, *in vivo* e *in vitro*, em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células mononucleares de cordão umbilical (CBMCs) e verificaram diminuição de 27 % na expressão de TNF- α e de aproximadamente 20 % na produção de IL-6 em PBMCs e diminuição na produção de TNF- α e IL-6 e na fosforilação do NF κ B em CBMCs. Suzuki-Kakisaka e cols (2013) investigaram o efeito do tratamento *in vitro* com 2.5 mM $MgSO_4$, em células THP-1 e em CBMCs estimuladas ou não com LPS, por ensaio de citometria de fluxo, ICS (intracytoplasmic staining) e ELISA sobre a produção das citocinas IL-1 β , TNF- α , and IL-8. Os autores também observaram diminuição da produção dessas citocinas.

Entretanto, um estudo verificou que a diminuição do Mg^{2+} e não a suplementação pode ter efeito supressor sobre a via do NF κ B. Zusso et al.(2017) investigaram o efeito da curcumina e seus análogos, conhecida por sua propriedade anti-inflamatória na neuroinflamação, e sua relação com os mecanismos envolvidos no processo de ligação TLR4-MD2, e o possível papel do Mg^{2+} na resposta inflamatória. Os autores verificaram em células microgliais, o efeito da diminuição da concentração desse mineral (0,1 mM Mg^{2+}) junto ao tratamento com curcumina, GG6 e GG9. Os resultados mostraram que os tratamentos com GG6, curcumina e baixo conteúdo do mineral apresentaram diminuição na concentração das citocinas

inflamatórias. Além disso, foi analisado o efeito da diminuição da concentração de Mg^{2+} na dimerização de TLR-4 e a translocação nuclear de $NF\kappa B$. Os dados mostraram diminuição da translocação de $NF\kappa B$ e supressão da dimerização de TLR-4 em células Ba/F3, nos cultivos com baixo conteúdo de Mg^{2+} .

Podemos notar que os dados da literatura de estudos sobre os efeitos do Mg^{2+} na concentração de citocinas são diversos, e resultados controversos aparecem o tempo todo. Isso pode ocorrer devido aos diversos delineamentos experimentais, como doses, tempo e tipos de estímulos estudados, tipos celulares diferentes, que podem não ter as mesmas necessidades do conteúdo desse mineral para manter sua homeostase.

Sabemos que o papel imunossupressor da CTM também envolve a produção deIDO (Indoleamine 2,3 – dyoxigenase), prostaglandina E2 (PGE2), $TNF-\alpha$ e $TGF-\beta$, porém, dependendo da concentração dessas citocinas no microambiente, a célula mesenquimal pode apresentar um fenótipo pró-inflamatório ou imunossupressor (MA et al., 2016).

O $TGF-\beta$ é membro de uma família composta por 33 citocinas, sendo produzido como complexo inativo, que é ativado para se ligar ao receptor resultando em diferentes efeitos, tanto pró- como anti-inflamatório no sistema imune, dependendo da quantidade secretada e do tipo celular estudado (WORTHINGTON et al., 2013). Zhou e cols (2008) demonstraram o papel duplo do $TGF-\beta$ e seu envolvimento nos linfócitos Th17 e Treg de camundongos. A diferenciação desses tipos celulares é dependente dessa citocina e da expressão dos fatores de transcrição ROR γ t (Th17) e Foxp3 (Treg) respectivamente. Os autores observaram que baixas concentrações de $TGF-\beta$ agiu sinergicamente com IL-6 e IL-21, promovendo a expressão do receptor IL-23 (IL-23r) favorecendo a diferenciação de células Th17, e que o oposto, altas concentrações dessa citocina, poderia inibir a expressão de IL-23r, estimulando a proliferação de células Treg.

Nossos achados mostram que células C3H/10T1/2 tratadas com 3 e 5 mM Mg^{2+} / L e estimuladas com LPS foram capazes de aumentar a concentração de $TGF-\beta$, que poderia estimular a proliferação de células Treg, e inibir a ativação de células NK, juntamente através da liberação de fatores supressores, como o próprio $TGF-\beta$. Entretanto, embora esteja claro o papel do $TGF-\beta$ como um agente imunossupressor nas células mesenquimais, um estudo realizado por XU et al. (2014) demonstrou que o aumento de $TGF-\beta$ pode exercer efeito autócrino em

células mesenquimais. Os autores avaliaram o quanto o TGF- β poderia agir sinergicamente com as células mesenquimais em co-cultura com esplenócitos ativados, esperando efeito sinérgico de imunossupressão. Os resultados mostraram que o TGF- β produzido pela célula mesenquimal não aumentou a imunossupressão e sim reduziu a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), anulando o efeito imunossupressor das células mesenquimais. LI et al. 2012 também observaram que a quantidade produzida de óxido nítrico no microambiente é fator crucial para a determinação do fenótipo imunoestimulatório ou imunossupressor da célula mesenquimal.

A análise da expressão de STAT3 mostrou que não houve diferença na razão pSTAT3/STAT3, quando as células foram estimuladas com TNF- α . Como foi observado aumento da concentração de IL-10 e do potencial proliferativo, pode ter ocorrido translocação para o núcleo e atividade transcricional parcialmente independente da via de fosforilação (QI & Yang, 2014). Por outro lado, verificamos o contrário quando as células foram estimuladas com LPS. Houve maior razão Ser-727pSTAT3/STAT3 quanto maior a concentração de Mg²⁺. Nesse contexto, dados da literatura apontam que STAT3 pode translocar para dentro da mitocôndria (XU et al., 2016). Uma vez que haja fosforilação p-Ser-STAT3 e translocação para a mitocôndria, o STAT3 pode controlar o metabolismo e respiração celular, além de fornecer proteção contra a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP - mitochondrial permeability transition pore) pela ação de espécies reativas de oxigênio, ao se ligar a ciclofilina D (BOENGLER et al., 2010). Nesse contexto, o Mg²⁺ também tem importante papel na mitocôndria, compartimento esse que conta com o maior pool intracelular desse mineral (KUBOTA et al., 2005). Enquanto o aumento do conteúdo mitocondrial de Ca²⁺ favorece o MPTP, o Mg²⁺ age contrariamente e pode modular indiretamente o MPTP, sendo que a deficiência extramitocondrial desse mineral pode contribuir para a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (ROMANI et al., 2007; DOLDER et al., 2003).

Os resultados apresentados mostram que o Mg²⁺ é capaz de influenciar o fenótipo da célula C3H/10T1/2 e modular a produção de algumas citocinas, além de aumentar seu potencial proliferativo.

II) Estudo com os 'meios condicionados'

A célula tronco mesenquimal é capaz de modular grande parte das células imunes através da produção de citocinas. Macrófagos e linfócitos são células que possuem papel chave na regulação imune. Buscando investigar se as moléculas produzidas pelas células C3H/10T1/2 durante o tratamento com diferentes concentrações de Mg^{2+} seriam capazes de modular a produção de citocinas e a viabilidade de macrófagos e linfócitos, investigamos o efeito do 'meio-condicionado' na viabilidade e produção de citocinas de células RAW 264.7 (como modelo de macrófagos) e em células linfóides primárias do baço de camundongos C57Bl/6. Nossos dados mostraram diminuição significativa na viabilidade de macrófagos e de células linfóides do baço cultivadas com 'meio condicionado'.

Quanto a produção de citocinas inflamatórias, macrófagos cultivados com 'meios condicionados' das células C3H/10T1/2 independente da concentração de Mg^{2+} , apresentaram menor concentração de IL-1 β e IL-6 comparados ao seu controle, sendo esse efeito maior nas células tratadas com 5 mM Mg^{2+} / L e desafiadas com LPS, com um efeito sinérgico do Mg^{2+} na concentração de 5 mM Mg^{2+} / L. Também apresentaram menor concentração de TNF- α e maior concentração de IL-10 nas células cultivadas com 'meios condicionados' e estimuladas com LPS. Quando as células foram estimuladas com TNF- α , apenas o meio condicionado sem Mg^{2+} diferiu do seu controle na concentração de IL-1 β , enquanto que a concentração de IL-6 foi menor nas células tratadas com os 'meios condicionados', sendo esse efeito mais pronunciado na concentração de 5 mM Mg^{2+} / L, onde observamos um efeito sinérgico do aumento da concentração de Mg^{2+} e do 'meio condicionado'.

Na análise da concentração de citocinas nas células linfóides do baço, observamos que o 'meio condicionado' não exerceu nenhum efeito sobre a produção de IFN- γ . Entretanto, verificamos aumento da concentração da IL-17 nas células tratadas com 'meios condicionados' e estimuladas com LPS, porém a concentração de IL-17 foi menor nas células tratadas com o 'meio condicionado' na concentração de 5 mM Mg^{2+} / L. Esse efeito parece ser dependente apenas do 'meio condicionado', porque não houve diferença entre os controles nas diferentes concentrações de Mg^{2+} . Quando as células foram estimuladas com TNF- α observamos aumento da concentração de IL-17 nas células tratadas com os 'meios condicionados' comparados aos respectivos controles, independente da concentração de Mg^{2+} , entretanto os 'meios condicionados' não diferiram entre si.

A IL-4 é uma citocina que atua como um agente anti-inflamatório, bloqueando a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Não foi observada diferença significativa na concentração de IL-4 no sobrenadante das células estimuladas com TNF- α . Nas células que receberam LPS verificamos diminuição da concentração de IL-4 no sobrenadante das células tratadas com 'meio condicionado' na concentração de 5 mM Mg²⁺ / L, comparado ao seu controle, embora os 'meios condicionados' não diferiram entre si. Entretanto, é possível notar que a concentração de IL-4 foi maior no sobrenadante do meio controle com 5 mM Mg²⁺ / L, sendo que o Mg²⁺, por si só, foi capaz de aumentar a concentração dessa citocina. Adicionalmente, observamos aumento da concentração de IL-10 nas células cultivadas com os 'meios condicionados' e estimuladas com LPS quando comparados aos seus respectivos controles. Embora os 'meios condicionados' não tenham diferido entre si, nós observamos que a concentração de IL-10 no meio controle com 5 mM Mg²⁺ / L foi maior quando comparamos com o meio sem esse mineral, demonstrando que o Mg²⁺ é capaz de alterar a produção dessa citocina, mesmo sem efeito sinérgico com o 'meio condicionado'. No sobrenadante das células estimuladas com TNF- α , observamos maior concentração de IL-10 no sobrenadante das células cultivadas com 'meios condicionados', sendo que o Mg²⁺ não exerceu nenhum efeito, independente da concentração.

Capítulo 2

O consumo de Mg²⁺ tem diminuído consideravelmente nas últimas décadas (ALTURA et al., 1991; 2014), e um número crescente de estudos em humanos e animais têm relacionado a inadequação dietética e / ou a deficiência desse mineral com predisposição à inflamação e íntima relação com resistência à insulina. Em indivíduos hospitalizados em UTI (unidade de terapia intensiva), a desregulação do metabolismo do Mg²⁺ está relacionada com piora do prognóstico, aumento do tempo de internação, maior ocorrência de sepse e aumento da mortalidade, quando comparado à pacientes em estado crítico sem hipomagnesemia (UPALA et al., 2016; JIANG et al., 2016). Pouco se sabe sobre as repercussões da deficiência de Mg²⁺ sobre a hematopoese. Nesse contexto, investigamos os efeitos da restrição na ingestão de Mg²⁺ por 4 semanas sobre as células da medula óssea num modelo experimental.

Durante o período experimental não foram verificados sinais clássicos de hipomagnesemia, como eritema, irritabilidade e convulsões. Nesse sentido, Alcock & Shils (1974) compararam a presença desses sinais clínicos em ratos e camundongos durante a indução à deficiência de Mg^{2+} , e verificaram que camundongos não apresentaram os sinais clínicos clássicos de hipomagnesemia tal como os ratos.

Nós não observamos diferença significativa entre os grupos quanto ao peso, consumo de ração e água. De acordo com esse achado, Rude et al. (2003) também não observaram diferenças no ganho de peso de camundongos BALB/c adultos (5-7 meses) submetidos a uma dieta restrita em Mg^{2+} por 4 semanas. Por outro lado, verificaram menor ganho de peso quando esses animais completaram 6 semanas de restrição, e o mesmo achado no grupo de camundongos jovens (28 dias de idade) submetidos a dieta com restrição de Mg^{2+} por 2 semanas. Adicionalmente, observaram em todos os grupos experimentais, diminuição da concentração sérica de Mg^{2+} e aumento da concentração de Ca^{2+} .

Em relação aos nossos resultados, não foram observadas diferenças nos parâmetros séricos de proteínas, albumina, pré-albumina e nem em marcadores inflamatórios como PCR e TNF- α . A análise da concentração sérica de magnésio e cálcio corrobora com a literatura. Observamos diminuição da concentração de Mg^{2+} , esperado para o modelo de hipomagnesemia, e aumento da concentração de Ca^{2+} nos animais que consumiram dieta deficiente em Mg^{2+} . Entretanto, Alcock & Shils (1974) observaram que diferentemente de ratos, camundongos apresentavam hipocalcemia durante a hipomagnesemia. A hipercalcemia em ratos durante a deficiência em Mg^{2+} está descrita na literatura e relacionada ao aumento da atividade da glândula paratireoide (GITELMAN et al., 1968; ALCOCK & SHILS, 1974; INABA et al., 1992). Durante a deficiência em Mg^{2+} , uma parte da fração da superfície óssea desse mineral pode ser liberada durante os processos de reabsorção óssea, resultando em liberação de Ca^{2+} para a circulação aumentando a sua concentração sérica. De uma maneira geral, tanto a hipercalcemia quanto a hipocalcemia são condições resultantes de alterações na homeostase da paratireoide (HOORN & ZIETSE, 2013).

Dados da literatura apontam que a deficiência de Mg^{2+} pode resultar em aumento da contagem de leucócitos totais no sangue periférico, aumento do número de neutrófilos, diminuição de eritrócitos e de hemoglobina em ratos, mas os

mecanismos que resultam nesses achados não estão totalmente esclarecidos (MALPUECH-BRUGÈRE et al. 2000; BUSSIÈRE et al., 2002; ORDEN et al., 2006). Entretanto, em nosso estudo não observamos diferença significativa na contagem de leucócitos totais, eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Porém, na análise microscópica diferencial de leucócitos no sangue periférico, foi possível observar aumento significativo da contagem de neutrófilos nos animais deficientes em Mg^{2+} quando comparados ao grupo controle.

Neutrófilos são leucócitos que atuam na primeira linha de defesa celular do organismo contra diversos tipos de agentes infecciosos, através do mecanismo de fagocitose e produção de moléculas citotóxicas, e não por acaso, aproximadamente 60 % dos leucócitos na medula óssea são precursores de granulócitos (KENEDY & DeLEO, 2009). Para entender as repercussões da deficiência dietética de Mg^{2+} que resultam em aumento de neutrófilos no sangue periférico, investigamos o impacto da influência da restrição desse mineral sobre a medula óssea. Nós observamos que a deficiência dietética de Mg^{2+} não alterou a contagem de células totais da medula óssea.

Os dados da análise de imunofenotipagem da medula óssea mostraram diferença significativa nos progenitores da linhagem granulocítica, com aumento das populações de células marcadas para CMP (Common myeloid progenitor), GMP (granulocyte/macrophage progenitor) e Ly6G (GR1) (proteína ligada a superfície de neutrófilos de camundongos) no grupo deficiente comparado com o controle. Esses dados corroboram a análise de mielograma, pois observamos um aumento na contagem absoluta de blastos e de células jovens da linhagem granulocítica (granulócitos jovens e em anel). Nesse sentido, alguns achados do nosso estudo corroboram com o trabalho desenvolvido por McCreary et al. (1967). Esses autores observaram que a deficiência em Mg^{2+} resultou em hiper celularidade, maior porcentagem de células da série granulocítica na medula óssea de ratos, e até o desenvolvimento de um animal leucêmico com infiltrado granulocítico em vários órgãos.

Dados da literatura apontam que células mielóides parecem privilegiar a diferenciação para linhagem granulocítica durante a deficiência em Mg^{2+} . Por exemplo, Covacci et al (1998) avaliaram, *in vitro*, os efeitos da restrição de Mg^{2+} em células HL-60 (human leukemic HL-60). Os resultados apresentados mostraram que a restrição extracelular desse mineral no meio de cultura resultou em diferenciação

granulocítica desse tipo celular, e que o padrão morfológico e a propriedade funcional dessas células foram equiparáveis aos das células cuja diferenciação foi induzida por DMSO. Os autores observaram que essas alterações podem estar associadas ao aumento da expressão do Inibidor da CDK p27Kip¹, sugerindo uma possível relação entre mecanismos de controle do ciclo celular e o processo de diferenciação, e que o conteúdo e a distribuição de Mg²⁺ intracelular, tanto na restrição desse mineral, quanto nas células desafiadas com DMSO, parece ser fundamental para o processo de diferenciação celular. Nós observamos nas células da medula óssea de animais deficientes em Mg²⁺ alteração no ciclo celular, com menor número de células na fase S/G2/M bem como uma tendência à diminuição na expressão proteica de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), sendo que o PCNA é importante para os processos de duplicação e reparo do DNA (BOEHM et al., 2016; KELMAN, 1997). Dados da literatura mostram que o Mg²⁺ também tem papel relevante na progressão do ciclo celular e na fidelidade da replicação do DNA, entre outros (WOLF & CITTADINI, 1999; HARTWIG, 2001; IKARI et al., 2011). Portanto, é esperado que alteração na homeostase desse mineral possa interferir nesses processos celulares e em proteínas envolvidas nos mecanismos de proliferação e reparo de DNA.

Na medula óssea, a CTH (Célula Tronco Hematopoiética) pode se comprometer e se diferenciar na linhagem mielóide (granulócitos, macrófagos e células dendríticas) ou linfóide (linfócitos T, B e NK). Uma vez que a CTH esteja comprometida com a linhagem mielóide, os próximos eventos ocorrem sob a influência de diversos fatores de transcrição, que incluem, por exemplo, C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding proteins), que apresenta papel chave em inúmeros processos, como na diferenciação, proliferação e morte celular, e GATA1 (essencial para megacariócitos e eritrócitos), entre outros, sendo que o aumento da expressão de C/EBP- α é fundamental para a diferenciação de granulócitos (LAWRENCE et al., 2018; MA et al., 2014). Nesse contexto, C/EBP- α é indispensável para a diferenciação de CMP (Common myeloid progenitor) em GMP (granulocyte/macrophage progenitor) (LAWRENCE et al., 2018).

Além de C/EBP- α , CSF3 (Fator estimulador de colônia 3) também é fundamental para a diferenciação de progenitores mielóides, e também está relacionado com a produção de moléculas envolvidas no mecanismo de defesa por neutrófilos, como geração de ânion superóxido, fosfatase alcalina e mieloperoxidase,

entre outros (PALANDE et al., 2013). Como podemos observar, a expressão de genes como C/EBP- α e CSF3 são importantes para entender os mecanismos de diferenciação de granulócitos. Nós observamos aumento na expressão de C/EBP- α e CSF3 nas células da medula óssea de animais deficientes em Mg²⁺ comparados ao grupo controle, e esse achado corrobora nossas análises de citometria. Também observamos que a razão pSTAT3/STAT3, bem como a concentração de G-CSF, aumentaram durante a hipomagnesemia.

A literatura reporta que a proteína STAT3 é necessária para a progressão e maturação do ciclo celular de granulócitos em resposta ao G-CSF, resultando em um aumento de neutrófilos imaturos da medula óssea; por outro lado, STAT3 também pode atuar como um regulador negativo da granulopoese (McLemore et al., 2001; LEE et al., 2002; Zhang et al., 2010). Nossos resultados demonstram que a deficiência de Mg²⁺ modifica a expressão de STAT3 e a concentração de G-CSF, resultando em aumento dos neutrófilos na medula óssea de animais que consumiram uma dieta restrita em Mg²⁺. Ainda, o resultado do ensaio de formação de colônias mostrou que células primárias da medula óssea de camundongos deficientes em Mg²⁺ cultivadas em meio de cultura com e sem esse mineral apresentou maior contagem de UFC-G (Unidade Formadora de Colônia Granulocítica) quando comparados aos animais do grupo controle.

Nossos dados mostram que a restrição dietética de Mg²⁺ por 4 semanas influencia a maturação de granulócitos, especialmente a diferenciação de neutrófilos na medula óssea. Essa alteração foi independente tanto de inflamação (condição comum durante a hipomagnesemia) quanto de alteração no número dos leucócitos totais no sangue periférico ou das células totais da medula óssea, que poderiam resultar no aumento do número de neutrófilos circulantes e na medula óssea. Nosso trabalho observou que, em modelo experimental, a deficiência dietética de Mg²⁺ parece atuar nas etapas iniciais da diferenciação de granulócitos, alterando genes e fatores de transcrição envolvidos em ambos os processos relacionados à proliferação e diferenciação, principalmente de neutrófilos, antes mesmo de apresentar sinais de alteração inflamatória.

8. CONCLUSÃO

Frente aos resultados encontrados foi possível concluir, no estudo realizado *in vitro*, que o enriquecimento extracelular com Mg^{2+} exerce efeitos sobre as células C3H/10T1/2, com aumento da proliferação e diminuição da produção de citocinas inflamatórias, juntamente com diminuição da fosforilação de NF κ B. Posteriormente, observamos na análise do efeito desse tratamento sobre macrófagos e linfócitos potencialização da ação imunomoduladora. Na análise dos efeitos da restrição dietética de Mg^{2+} em um modelo experimental *in vivo*, concluímos que a hipomagnesemia acarreta em um quadro de neutrofilia periférica, não associado a processo inflamatório, mas ao aumento de progenitores granulocíticos medulares, além influenciar a expressão de genes, fatores de transcrição e citocinas envolvidas no processo de controle da granulopoese.

REFERÊNCIAS

- A. J. FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; K. V. PETRAKOVA. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Embryol. Exp. Morph.**, v. 16, n.3, p. 581-390, 1966.
- ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Ther**, v. 12, n.2, p.109-16, 2008.
- AFANASYEV, B. V.; ELSTNER, E. E; ZANDER, A. R. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. **CTT**, v.1, n.3, 2009.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, n.4, p.1815-22, 2005.
- AHMED, F.; MOHAMMED, A. Magnesium: The Forgotten Electrolyte-A Review on Hypomagnesemia. **Med Sci (Basel)**. v. 4, n. 7, 2019.
- AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T. et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**. v.9, n.404(6774), p.193-7, 2000.
- ALCOCK, N. W.; SHILS, M.E.; LIEBERMAN, P. H. et al. Thymic Changes in the Magnesium-depleted Rat'. **Cancer Res**. v. 33, p. 2196-204, 1973.
- ALCOCK, N.W.; SHILS, M.E. Comparison of magnesium deficiency in the rat and mouse. **Proc Soc Exp Biol Med**. n.146, p.137-41, 1974.
- ALMOZNINO-SARAFIAN, D.; BERMAN, S.; MOR, A. et al. Magnesium and C-reactive protein in heart failure: an anti-inflammatory effect of magnesium administration? **Eur J Nutr**. V.46, n. 4, p.230-7, 2007.
- ALTURA, B. M.; SHAH, N. C.; SHAH, G. J. et al. Short-term Mg deficiency upregulates protein kinase C isoforms in cardiovascular tissues and cells; relation to NF-kB, cytokines, ceramide salvage sphingolipid pathway and PKC-zeta: hypothesis and review. **Int J Clin Exp Med**. n. 7, p. 1-21, 2014.
- ALTURA, B.T.; ALTURA, B. M. Cardiovascular Risk Factors and Magnesium: Relationships to Atherosclerosis, Ischemic Heart Disease and Hypertension. **Magn Trace Elem**. v. 10, p. 182-192, 1991.
- ARNAUD, M.J. Update on the assessment of magnesium status. **Br J Nutr**. v.99 Suppl 3:S24-36, 2008.
- BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDELS, R. J. M. Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiol Rev**, v.95, p. 1–46, 2015.
- BARTHOLOMEW, A; STURGEON, C.; SIATSKAS, M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp. Hematology**, v. 30, p. 42–8, 2002.

- BELIN, R. J.; HE, K. Magnesium physiology and pathogenic mechanisms that contribute to the development of the metabolic syndrome. **Magnes Res**, v. 20, p.107-29, 2007.
- BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**. v. 13, n. 3, p. 392-402, 2013.
- BIANCO, P.; KUZNETSOV, S.A.; RIMINUCCI, M. et al. Postnatal skeletal stem cells **Methods Enzymol**, v.419, p. 117–148, 2006.
- BIANCO, P. Back to the Future: Moving Beyond “Mesenchymal Stem Cells”. **J. Cell. Biochem.** v. 112, p.1713–21, 2011.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**. v.2, n.4, p. 313–319, 2008.
- BOEHM, E.M.; GILDENBERG, M.S.; WASHINGTON, M.T. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. **Enzymes**. n.39, p.231–254, 2016.
- BOENGLER, K.; HILFIKER-KLEINER, D.; HEUSCH, G. et al. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. **Basic Res Cardiol**. v.105, n. 6, 2010.
- BOHNSACK, B. L.; HIRSCHI, K. K. Nutrient regulation of cell cycle progression. **Annu Rev Nutr** . v. 24, p. 433-453, 2004.
- BORELLI, P.; BARROS, F.E.V.; NAKAJIMA, K. et al. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 523-530, 2009.
- BÖRGER, V.; BREMER, M.; FERRER-TUR, R. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. **Int J Mol Sci**. v.6, p.18, n.7, 2017.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Normativas do CONCEA**, 2015.
- BUSSIÈRE, F.; MAZUR, A.; FAUQUERT, J.L. et al. High magnesium concentration in vitro decreases human leukocyte activation. **Magnes Res**. v. 15, p. 43-8, 2002.
- CAPLAN, A. I. “Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!” **STEM CELL TRANSL**. v. 6, n. 6, p.1445-1451, 2017.
- CAPLAN, A.I. What’s in a name? **Tissue Eng Part A**. v.16, p. 2415–2417, 2010.
- CASTIGLIONI, S.; CAZZANIGA, A.; ALBISETTI, W. Magnesium and Osteoporosis: Current State of Knowledge and Future Research Directions. **Nutrients**, n.5, p. 3022-33, 2013.

CHAIGNE-DELALANDE, B.; LENARDO, M. M. Divalent cation signaling in immune cells. **Trends Immunol.** v. 35, n.7, p. 332–344, 2014.

CHAIGNE-DELALANDE, B.; LI, F. Y.; O'CONNOR, G. M. et al. Mg²⁺ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. **Science.** v. 341, n. 6142, p. 186–191, 2013.

CHAKO, S. A.; SONG, Y.; Relations of dietary magnesium intake to biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in an ethnically diverse cohort of postmenopausal women. **Diabetes Care**, v.33, n.2, p.304-10, 2010.

CHARBORD, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts: Bone marrow MSC history and concepts. **Hum Gene Ther**, v. 21, n.9, p.1045-56, 2010.

CHE, N.; LI, X.; ZHOU, S. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. **Cell Immunol.** v. 274, p.46-53, 2012.

CHEN, L.; TREDGET, E.E.; WU, P.Y. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS One.** V.2, n.3, p. 4:e1886, 2008.

CHENG. H.; FENG, J. M.; FIGUEIREDO, M. L. et al. Transient receptor potential melastatin type 7 channel is critical for the survival of bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** v. 19, n. 9, p.1393–1403, 2010.

CIFUENTES, S. C.; BENSIAMAR, F.; GALLARDO-MORENO, A. M. Incorporation of Mg particles into PDLLA regulates mesenchymal stem cell and macrophage responses. **J. Biomed. Mater. Res. B**, v.104, p.866-78, 2016.

CIPRIANO, A. F.; SALLEE, A.; GUAN, R. G. et al. Investigation of magnesium–zinc–calcium alloys and bone marrow derived mesenchymal stem cell response in direct culture. **Acta Biomater.** v. 12, p. 298–321, 2015.

COOPER, A.; BLACK, J. Lecturer in Chemistry, Glasgow University, p.1756-66, 1999. In <http://www.chem.gla.ac.uk/~alanc/dept/black.htm>. Access 27.10.2016.

CORTEZ, M.; ROGERO, M. M.; BORELLI, P. et al. A High-Fat Diet Increases IL-1, IL-6, and TNF- α Production by Increasing NF- κ B and Attenuating PPAR- γ Expression in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Inflamm.**, v. 36, p. 379-386, 2012.

COVACCI, V.; BRUZZESE, N.; SGAMBATO, A. et al. Magnesium restriction induces granulocytic differentiation and expression of p27Kip1 in human leukemic HL-60 cells. **J Cell Biochem.** v.70, n.3, p. 313-22, 1998.

DAVIES, L.C.; HELDRING, N.; KADRI, N. et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. **Stem Cells.** V.35, n.3, p.766-776, 2017.

DAZZI, F.; LOPES, L.; WENG, L. Mesenchymal stromal cells: a key player 'innate tolerance'? **Immunology**, v.137, p.206-13, 2012.

DE OLIVEIRA, A.R.; CRUZ, K.J.; MORAIS, J.B. et al. Magnesium Status and Its Relationship with C-Reactive Protein in Obese Women. **Biol Trace Elem Res.** 2015 n.68, v.2,p.296-302, 2015.

DE ROSA, V.; GALGANIA, M.; SANTOPAULO, M. et al. Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. **Semin Immunol.**, n. 27, p.300-09, 2015.

DOLDER, M; WALZEL, B.; SPEER, O. et al. Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition by Creatine Kinase Substrates. **J Biol Chem.** v. 278, n. 20, p. 17760–66, 2003.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al.I. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

ELIN, R. J. Assessment of Magnesium Status. **Clin Chem.**, v.33, 1987.

ELIN, R. J.; UTTER, A.; TAN, H. K. et al.. Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats. **Am J Pathol.** v.100, n. 3, p.765–778,1980.

ELIN. R. J. Magnesium: The fifth but forgotten electrolyte. **Clin Chem**, v. 102, n. 5, 1993.

ELISAF, M.; MERKOUROPOULOS, M.; TSIANOS, E.Y. et al. Pathogenetic Mechanisms of Hypomagnesemia in Alcoholic Patients. 1. **Trace Elements Med. Biol.** v. 9, pp. 210-214, 1995.

EL-TANBOULY, D. M.; ABDELSALAM, R. M.; ATTIA, A. S. et al. Pretreatment with magnesium ameliorates lipopolysaccharide induced liver injury in mice. **Pharmacol Rep.** v. 67, p. 914–20, 2015.

FAZLIAH M.N. S. N.; YUSUF, M.M.; ABDULLAH, T.K. et al. Human mesenchymal stem cells response to magnesium-based biomaterials. **Procedia Chem.** v. 19, p.75 – 82, 2016.

FINE, K. D.; ANA, C. A. S.; PORTER, J. L. et al. Intestinal Absorption of Magnesium from Food and Supplements. **J. Clin. Invest.** The American Society for Clinical Investigation, Inc. v. 88, p. 396-402, 1991.

FLEIG, A.; PENNER, R. The TRPM7 ion channel subfamily: the molecular, biophysical and functional features. **Trends Pharmacol Sci.** v. 25, n. 12, 2004.

FUJIWARA Y, MINOR DL Jr. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. **J Mol Biol.** 2008;383(4):854–870.

GAO, F.; CHIU, S. M.; MOTAN, D. et al. Mesenchymal stem cells and

immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death Dis.**, v.7, 2016.

GEBLER, A.; ZABEL, O. S. B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trend Mol Med**, v.2, p. 128-34, 2012.

GHANNAM, S. F.; BOUFFI, C.; DJOUAD, F. et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. **Stem Cell Res Ther.**, p. 2-7, 2010.

GITELMAN, H.J.; KUKOLJ, S.; WELT, L.G. The influence of the parathyroid glands on the hypercalcemia of experimental magnesium depletion in the rat. *J Clin Invest.* v.47, n.1, p.118–126, 1968.

GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. **World J Stem Cells**, v.6, n.5, p. 526-39, 2014.

GLENNIE, S.; SOEIRO, I.; DYSON, P.J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood.** v.105, n.7, p.2821-7, 2005.

GROBBER, U.; SCHMIDT, J.; KISTERS, K. Magnesium prevention and therapy. **Nutrients.** v.7, n. 9, p. 8199-226, 2015.

HANIFFA, M. A.; WANG, X. N.; HOLTICK, U. et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. **J Immunol.** v,179, n. 3, p.1595-604, 2007.

HARLOW, E.; LANE, D.P. Antibodies: a laboratory manual. **Cold spring harbor**, 1988.

HARTWIG, A. Role of magnesium in genomic stability. **Mutat Res.**v. 475, n. 1–2, 2001, p.113-121

HOOGDUIJN, M. J. Are mesenchymal stromal cells immune cells? **Arthritis Res Ther.** , v.17, p.88, 2015.

HOORN, E.J.; ZIETSE, R. Disorders of calcium and magnesium balance: a physiology-based approach. **Pediatr Nephrol.** v.28, n.8, p.1195-206, 2013.

HUNG, C.C.; CHAYA, A.; LIU, K. et al. The role of magnesium ions in bone regeneration involves the canonical Wnt signaling pathway. **Acta Biomater.** V.15, n.98, p.246-255, 2019.

IKARI, A.; SAWADA, H.; SANADA, A. et al. Magnesium deficiency suppresses cell cycle progression mediated by increase in transcriptional activity of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} in renal epithelial NRK-52E cells. **J. Cell. Biochem.**, n.112, p. 3563-3572, 2011.

INABA, M.; OKUNO, S.; IMANISHI, Y. et al. Magnesium deficiency enhances secretion of parathyroid hormone in normal and 5/6-nephrectomized uremic rats. **J Endocrinol Invest.** v.15(9 Suppl 6), p.135-42, 1992.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride**. Washington, DC: National Academy Press, 1997.

JAHNEN-DECHENT, W.; KETTELER, M. Magnesium basics. **Clin Kidney J**, v. 5, p. 3-14, 2012.

JIA, S.; MOU, C.; MA, Y. et al. Magnesium regulates neural stem cell proliferation in the mouse hippocampus by altering mitochondrial function. **Cell Biol Int**. v.40, n.4, p.465-71, 2016.

JIANG, P.; LV, Q.; LAI, T. et al. Does Hypomagnesemia Impact on the Outcome of Patients Admitted to the Intensive Care Unit? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Shock**, n. 6, 2016.

KARNES, J.M.; DAFFNER, S.D.; WATKINS, C.M. et al. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing. **Bone**. n.78, p.87-93, 2015.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**. v.13, n.14, p.629-40, 1997.

KENNEDY, A.D.; DELEO, F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol Res**. v.43,n.1-3,p.25-61, 2009.

KING, D. E.; MAINOUS, A. G.; GEESEY, M. E.; WOOLSON, R. F. Dietary Magnesium and C-reactive Protein Levels. **J Am Coll Nutr**, v. 24, n.3, p. 166–171, 2005.

KOPEN, G. C.; PROKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **PNAS**, v. 96, p. 10711-16, 1999.

KOPP, H.G.; AVECILLA, S.T.; HOOPER, A.T. et al. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. **Physiology** (Bethesda). v.20, p.349-56, 2005.

KORDELAS, L.; REBMANN, V.; LUDWIG, A.K. et al. MSC-derived exosomes: A novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. **Leukemia**. v.28, p.970–973, 2014.

KRAMPERA, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v. 39, p. 678–83, 2006.

KRISHNAMOORTHY, M.; WASIM, L.; BUHARI, F.H.M. et al. The channel-kinase TRPM7 regulates antigen gathering and internalization in B cells. **Sci Signal**. V.5; n.11, p.533, 2018.

KRUEGER JR, R. C.; SANTORE, M. T.; DAWSON, G. et al. Increased Extracellular Magnesium Increases Cellular Viability and Cellular Proliferation in Primary Cell

Culture of Embryonic Chick Telencephalon: Mechanisms of Magnesium's Action. **Pediatr. Res.** n. 45, p. 55A–55A, 1999.

KUBOTA, T.; SHINDO, Y.; TOKUNO, K. et al. Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imagings in PC12 cells. **Biochim Biophys Acta.** v.15, n.1744, p.19-28, 2005.

KWON, MIN-SOO, OH, M. Y.; OH, KI-WOOK et al.. The immunomodulatory effects of human mesenchymal stem cells on peripheral blood mononuclear cells in ALS Patients. Journal of neurochemistry. **J NEUROCHEM, P 1-13, 2014.**

LAWRENCE, S. M.; CORRIDEN, R.; NIZET, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.7;n.82, p.1, 2018.

LEE, C.K.; RAZ, R.; GIMENO, R. et al. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. **Immunity.** v.17, n.1, p.63-72, 2002.

LEE, P. Y.; YANG, C. H.; KAO, M. C. et al. Phosphoinositide 3-kinase β , phosphoinositide 3-kinase, and phosphoinositide 3-kinase mediate the anti-inflammatory effects of magnesium sulfate. **J Surg Res.** n. 197, p. 390-397, 2015.

LI N, HUA J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. **Cell Mol Life Sci.** v.74, n.13, p. 2345-2360, 2017.

LI, F. Y.; CHAINE-DELALANDE, B.; SU, H. et al. XMEN disease: a new immunodeficiency affecting Mg^{2+} regulation of immunity against Epstein-Barr virus. **Blood,** n. 123, p. 2148-52, 2014.

LI, W.; REN, G.; HUANG, Y. et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. **Cell Death Differ.;**v.19, n.9, p.1505–1513, 2012.

LIBAKO, P.; MILLER, J.; NOWACKI, W. et al. Extracellular Mg concentration and Ca blockers modulate the initial steps of the response of Th2 lymphocytes in co-culture with macrophages and dendritic cells. **Eur Cytokine Netw.** v. 23 p. 1-4, 2015.

LUTHRINGER, B. J. C.; WILLUMEIT-RÖMER, R. Effects of magnesium degradation products on mesenchymal stem cell fate and osteoblastogenesis. **Gene.** n. 575, p. 9–20, 2016.

LUZ-CRAWFORD, P.; KURTE, M.; BRAVO-ALEGRÍA, J. et al. Mesenchymal stem cells generate a $cd4+cd25+foxp3+$ regulatory t cell population during the differentiation process of th1 and th17 cells. **Stem Cell Res Ther.** v.4, n.4, p.3:65, 2013.

MA, O. K. F.; CHAN, K. H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. **World J Stem Cells**. v. 8, n.9, p. 268-78, 2016.

MA, O.; HONG, S.; GUO, H. et al. D.Granulopoiesis requires increased C/EBP α compared to monopoiesis, correlated with elevated Cebpa in immature G-CSF receptor versus M-CSF receptor expressing cells. **PLoS One**. V.21; n.9, p.4:e95784. 2014.

MA, S.; XIE1, N.; LI, W. et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ.**, v. 21, p. 216–25, 2014.

MALPUECH-BRUGÈRE, C.; NOWACKI, W.; DAVEAU, M. Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. **Biochem Biophys Acta**, v. 1501, p.91-98, 2000.

MALPUECH-BRUGÈRE, C.; NOWACKI, W.; GUEUX, E. et al. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress. **Br J Nutr** , v. 81, p. 405–411, 1999.

MARADZE, D.; MUSSON, D.; ZHENG, Y. et al. High Magnesium Corrosion Rate has an Effect on Osteoclast and Mesenchymal Stem Cell Role During Bone Remodelling. **Sci Rep**. v.3, p.8, 2018.

MATSUDA-LENNIKOV M.; BIANCALANA M.; ZOU J. et al. Magnesium transporter 1(MAGT1) deficiency causes selective defects in N-linked glycosylation and expression of immune-response genes. **J Biol Chem**. v. 294, p. 13638-13656, 2019.

MAXIMOW AA. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. **Physiol Rev**. n.IV, p.533-563, 1924.

MAZUR, A.; MAIER, J. A. M.; ROCK, E. et al. Magnesium and the inflammatory response: Potential physiopathological implications. **Arch of Biochem and Biophys**. n. 458, p. 48–56, 2007.

MCCREARY, P.A.; BATTIFORA, H.A.; HAHNEMAN, B.M. et al. Leukocytosis, bone marrow hyperplasia and leukemia in chronic magnesium deficiency in the rat. **Blood**. v.29, n.4, Suppl:683-90, 1967.

MCLEMORE, M.L.; GREWAL, S.; LIU, F. et al. STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. **Immunity**. v.14, n.2, p.193-204, 2001.

MELLO, A. S.; DE OLIVEIRA, D. C.; BIZZARRO, B, et al. Protein Malnutrition Alters Spleen Cell Proliferation and IL-2 and IL-10 Production by Affecting the STAT-1 and STAT-3 Balance. **Inflammation**, v. 6, p. 2125-38, 2014.

MORRISON, S.J.; SCADDEN, D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**. v.505, n.7483, p.327–334, 2014.

- MOSLEHI, N.; VAFA, M. R.; RAHIMI-FOROUSHANI, A. et al. Effects of oral magnesium supplementation on inflammatory markers in middle-aged overweight women. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Med Sciences*. n.17, p. 607-614, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*, n.65, p. 55-63, 1983.
- MULTHAUF, R. P. A history of magnesia alba. *ANN SCI.*, v. 33, p. 197—200, 1976.
- MURDOCK, J. L.; NÚÑEZ, G. TLR4: The Winding Road to the Discovery of the LPS Receptor. *J. Immunol.* v.197, p. 2561-62, 2016.
- NADOLNI, W.; ZIERLER, S. The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. *Cells*. n.17, v.7, p.8,2018.
- NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K. Lifestyle Effects on Hematopoiesis and Atherosclerosis. *Circ. Res.*, v. 116, n. 27, p. 884-894, 2015.
- NARDERI, A.S.A.; REILLY JR., R.F. Hereditary etiologies of hypomagnesemia. *Nat Clin Pract Nephrol*. v.4, n.2, p. 80-89, 2008.
- NASSAR, W.; EL-ANSARY, M.; SABRY, D. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomater. Res*. p.20:21, 2016.
- NIELSEN, F. H. "Magnesium deficiency and increased inflammation: current perspectives." *J Inflamm Res*, v. 11, p. 25-34, 2018.
- OGAWA M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. v. 81, p. 2844-2853, 1993.
- ORDEN, R. V. O.; EGGETT, D. L.; FRANZ, K. B. Influence of graded magnesium deficiencies on white blood cell counts and lymphocyte subpopulations in rats. *Magnes Res*. v. 19, p. 93-101, 2006.
- ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. v. 132, n. 22, p. 631–644, 2008.
- OWEN, R.D. Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses between Bovine Twins. *Science*. v.102, p.400-401, 1945.
- PALANDE, K.; MEENHUIS, A.; JEVDJOVIC, T. et al. Scratching the surface: signaling and routing dynamics of the CSF3 receptor. *Front Biosci* (Landmark Ed). V. 1, n.18, p.91-105, 2013.
- PAPAYANNOPOULOU, T.; SCADDEN, D.T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*. v.15, p. 3923-30, 2008.

- PARK, B. S.; LEE, JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Exp & Mol. Med.** n. 45, e 66, 2013.
- PETRAULT, I.; ZIMOWSKA, W.; MATHIEU, J. et al. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. **Biochim Biophys Acta.** v. 1586, p. 92-8, 2002.
- PIOMELLI, S.; JANSEN, V.; DANCIS, J. The Hemolytic Anemia of Magnesium Deficiency in Adult Rats. *Blood*, v.41, n.3, p.451-459, 1973. Accessed July 26, 2019. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/41/3/451>.
- PONTIKOGLOU, C.; DESCHASEAUX, F.; SENSEBÉ, L. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Stem Cell Rev and Rep.** v. 7, p.569–589, 2011.
- QI, Q.R.; YANG, Z.M. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. **World J Biol Chem.** v.5, n.2, p.231–239, 2014.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.**v.123, n.11, p.1939-51,1993.
- REZNIKOFF, C.A.; BRANKOW, D.W.; HEIDELBERGER, C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. **Cancer Res.** v. 33, n.12, p. 3231-8, 1973.
- RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 4, p. 1-17, 2012.
- ROCHELSON, B.; DOWLING, O.; SCHWARTZ, N. et al. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NFB pathway. **J Reprod Immunol.** v. 73, p. 101–7, 2007.
- ROMANI, A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. **Arch of Biochem and Biophys.** n. 458, p. 90–102, 2007.
- ROMANI. A. M. P. Cellular magnesium homeostasis. **Arch. Biochem Biophys.** n. 512, p. 1–23, 2011.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coação de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancromicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan.** V.20, p. 315-328, 1947.
- RSC Royal Society Chemistry. *In* <http://www.rsc.org/periodic-table/element/12/magnesium>. Acess 27.10.2016.
- RUDE, R., GRUBER, H., WEI, L. et al. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. **Calcif Tissue Int.** n. 72, p. 32.

SALES CH; ROCHA VS ; SETARO L ; COLLI C . Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, p. 685-690, 2012.

SALES, C.H.; SANTOS, A.R.; CINTRA, D.E.; COLLI, C. Magnesium-Deficient High-Fat Diet: Effects on Adiposity, Lipid Profile and Insulin Sensitivity in Growing Rats. **Clinical Nutrition**, V.33, P. 879-888, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual 2. ed New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 v.3.

SANCHEZ-MORITO, N.; PLANELLAS, E.; ARANDA, P. et al. Influence of magnesium deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat. **J. Nutr. Biochem**, v.11, n. 2, p.103-108, 2000.

SARGENTI, A.; CASTIGLIONI S.; OLIVI, E. et al. Magnesium Deprivation Potentiates Human Mesenchymal Stem Cell Transcriptional Remodeling. **Int J Mol Sci**. v.9, p.19, 2018.

SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I. et al. Oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by Mesenchymal stem cells. **Blood**. n.109, p.228-34, 2007.

SCHLINGMANN, K. P.; ALDEGGER, S. K. M.; CHUBANOV, V. G. T.; TRPM6 and TRPM7 – Gatekeepers of human magnesium metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, p. 813-21, 2007.

SCHMITZ, C.; PERRAUD AL.; JOHNSON, C. O. et al. Regulation of Vertebrate Cellular Mg²⁺ Homeostasis by TRPM7. **Cell**, v. 114, p. 191–200, 2003.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**. v. 4, p.7-25, 1978.

SHI, Y.; HU, G.; SU, J. et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Research**, v. 20, p. 510-18, 2010.

SHI, Y.; SU, J.; ROBERTS, A. I. et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends in Immunol.** v. 33, n. 3, 2012.

SIMENTAL-MENDÍA, L.E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; REYES-ROMERO, M.A. et al. No positive effect of oral magnesium supplementation in the decreases of inflammation in subjects with prediabetes: a pilot study. **Magnes Res**. v.25, n.3, p.140-6, 2012.

SMITH, C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. **Cancer Control**. v.10, p. 9-16, 2003.

SONTIA, B.; MONTEZANO, A. C. I.; PARAVICINI, T. et al. Downregulation of renal TRPM7 and increased inflammation and fibrosis in aldosterone-infused mice. **Hypertension**, v. 51, p. 915-21, 2008.

STRITT, S., NURDEN, P., FAVIER, R. *et al.* Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg²⁺ homeostasis and cytoskeletal architecture. **Nat Commun** v.7, p.11097, 2016.

SU, N. Y.; PENG, T. C.; TSAI, P. S. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is involved in mediating the anti-inflammation effects of magnesium sulfate. **J Surg Resear.**, n. 185, p.726-32, 2013.

SUEZ, J.; KOREM, T.; ZEEVI, D. *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**. v.514, p.181–86, 2014.

SUGIMOTO, J.; ROMANI, A. M.; ALICE, M. *et al.* Magnesium Decreases Inflammatory Cytokine Production: A Novel Innate Immunomodulatory Mechanism. **J Immunol**. v. 188, p. 1-23, 2012.

SUZUKI-KAKISAKA, H.; SUGIMOTO, J.; TETARBE, M. *et al.* Magnesium sulfate increases intracellular magnesium reducing inflammatory cytokine release in neonates. **Am J Reprod Immunol**. v.70, n.3, p.213-20, 2013.

TAICHMAN, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. **Blood**, v.105, p. 2631-39, 2005.

TAM, M.; GÓMEZ, S.; GONZÁLEZ-GROSS, M *et al.* Possible roles of magnesium on the immune system. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 1193–1197, 2003.

TANG, Q.Q.; OTTO, T. C.; LANE, M. D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. **PNAS**. v. 101, n. 26, p. 9607–11, 2004.

TENNENBAUM, T.; YUSPA, S.H.; KAPITULNIK, J. Magnesium and phosphate enrichment of culture medium stimulates the proliferation of epidermal cells from newborn and adult mice. **J Cell Physiol**. v.143, n.3, p.431-8, 1990.

TILL, J.E.; MC, C.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat**. v.14, p.213–222, 1961.

TONG, G. M.; RUDE, R. K. Magnesium Deficiency in Critical Illness. **J Intensive Care Med**. v. 20, n. 1, 2005.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol**. v.8, n. 9, p.726-36, 2008.

UPALA, S.; JARUVONGVANICH, V.; WIJARNPREECHA1, K. *et al.* Hypomagnesemia and mortality in patients admitted to intensive care unit: a systematic review and metaanalysis. **QJM-INT J. Med.**, p.1–7, 2016.

VAN ORDEN, R.; EGGETT, D.L.; FRANZ, K.B. Influence of graded magnesium deficiencies on white blood cell counts and lymphocyte subpopulations in rats. **Magnes Res**. v.19, n.2, p. 93-101, 2006.

- VOETS, T.; NILIUS, B.; HOEFS, S. et al. TRPM6 Forms the Mg²⁺ Influx Channel Involved in Intestinal and Renal Mg²⁺ Absorption. **The J of biological chemistry**. v. 279, n. 1, p. 19–25, 2004.
- WANG, Y.; CHEN, X.; CAO, W. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature Immunol**. v.15, n.11, 2014.
- WANG, Z.; CHEN, A.; YAN, S. et al. Study of differentiated human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells transplantation on rat model of advanced parkinsonism. **Cell Biochem Funct**. v. 34, n. 6, p. 387-93, 2016.
- WEISS, A.R.R.; DAHLKE, M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. **Front Immunol**. v.4, p.10-1191, 2019.
- WEISSMAN, I.L.; SHIZURU, J.A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. **Blood**. V.1;n.112, p.3543-53, 2008.
- WITKOWSKI, M.; HUBERT, J.; MAZUR, A. Methods of assessment of magnesium status in humans: a systematic review. **Magnes Res**. v.24, n.4, p.163-80, 2011.
- WOLF, F.I.; CITTADINI, A. Magnesium in cell proliferation and differentiation. **Front Biosci**. V. 1; n. 4, p. D607-17, 1999.
- WU, L.; FEYERABEND, F.; SCHILLING, A. F. et al. Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture. **Connect Tissue Res**. v.55, 2014.
- WU, L.; FEYERABEND, F.; SCHILLING, A. F.; WILLUMEIT-RÖMER, R. et al. Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture. **Acta Biomater**.. n. 27, p. 294–304, 2015.
- XAVIER, J. G., FAVERO, M. E., VINOLO, M. A. R. et al. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histol Histopathol**, v.22, n.6, p. 651-60, 2007.
- XIAO, E.; CHEN, C.; ZHANG, Y. The mechanosensor of mesenchymal stem of transcription 3. **World J Biol Chem**. v. 5, p. 231-9, 2015.
- XIAO, E.; YANG, Q.; GAN, Y. H. et al. TRPM7 Senses mechanical Stimulation Inducing Osteogenesis in Human BoneMarrow Mesenchymal. Brief Reports: **STEM CELLS**. v. 33, p. 615–621, 2016.
- XU, C.; YU, P.; HAN, X. et al. TGF- β Promotes Immune Responses in the Presence of Mesenchymal Stem Cells. **Immunol**. v. 192, p. 103-09, 2014.

XU, Y.S.; LIANG, J.J.; WANG, Y. et al. STAT3 Undergoes Acetylation-dependent Mitochondrial Translocation to Regulate Pyruvate Metabolism. **Sci Rep**. v.22, n.6, p.39517, 2016.

YANAGI, T. Chemical Composition of Continental Crust and the Primitive Mantle. *In Arc Volcano of Japan*, Lecture Notes in Earth Sciences, n. 136, 2011.

YEE, N. S.; KAZI, A. A.; YEE, R. K. Cellular and developmental biology of TRPM7 channel-kinase: Implicated roles in cancer. **Cells**, n. 3, p. 751-777, 2014.

YOSHIZAWA, S; CHAYA, A.; VERDELIS, K. et al. An in vivo model to assess magnesium alloys and their biological effect on human bone marrow stromal cells. **Acta Biomater**.v.28, p. 234–9, 2015.

ZHANG, C. C.; LODISH, H. F. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. **Curr Opin Hematol**. v. 14, n. 4, p. 307-311, 2008.

ZHANG, H.; NGUYEN-JACKSON, H.; PANOPOULOS, A.D. et al. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. **Blood**. v. 7, n.116-14, p.2462-71, 2010.

ZHANG, L.; YANG, C.; LI, J. et al. High extracellular magnesium inhibits mineralized matrix deposition and modulates intracellular calcium signaling in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 450, p.1390–1395, 2014.

ZHANG, Y.; GAO, S.; XIA, J. et al. Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. **Trends Cell Biol**. V.28, n.2, p.976-986, 2018.

ZHAO, L.; LI, G.; CHAN, KAI-MING et al. Comparison of Multipotent Differentiation Potentials of Murine Primary Bone Marrow Stromal Cells and Mesenchymal Stem Cell Line C3H10T1/2. **Calcif Tissue Int**, n.84, p.56–64, 2009.

ZHENG, J.; MAO, X.; LING, J. et al. Role of Magnesium Transporter Subtype 1 (MagT1) in the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cells. **Biol trace Elem Res**. v.171, p. 131–137, 2016.

ZHOU, L.; LOPES, J. E.; CHONG, M. M. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma T function. **Nature**. v. 453, p. 236-40, 2008.

ZUSSO, M.; MERCANTI, G.; BELLUTI, F. et al. Phenolic 1,3-diketones attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by an alternative magnesium-mediated mechanism. **Br J Pharmacol**. v.174, n.10, p. 1090–1103, 2017.

ANEXO 1. CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 016.2018-P556

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do magnésio em modular o sistema imune e a capacidade imunomodulatória de células tronco mesenquimais em modelos experimentais in vitro e in vivo**, registrada com o nº **556**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Fabiana da Silva Lima**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **13 de abril de 2018**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/04/2018 a 30/09/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Número de animais	52
Peso/Idade	20g; 6 a 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério - USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 20 de abril de 2018.

Prof. Dra. Sabrina Epiphânio
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

APÊNDICE 1. TRABALHOS DECORRENTES



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 55 (2018) 200–208

Journal of
Nutritional
Biochemistry

An insight into the role of magnesium in the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells

Fabiana da Silva Lima^a, Amanda Batista da Rocha Romero^a, Araceli Hastreiter^b, Amanda Nogueira-Pedro^b, Edson Makiyama^b, Célia Colli^a, Ricardo Ambrósio Fock^{b,*}

^a Department of Food and Experimental Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 7 November 2017; received in revised form 4 January 2018; accepted 5 February 2018

Abstract

Magnesium (Mg^{2+}) is a mineral with the ability to influence cell proliferation and to modulate inflammatory/immune responses, due to its anti-inflammatory properties. In addition, mesenchymal stem cells (MSCs) modulate the function of all major immune cell populations. Knowing that, the current work aimed to investigate the effects of Mg^{2+} enrichment, and its influence on the immunomodulatory capacity of MSCs. Murine C3H/10T1/2 MSCs were cultivated in media with different concentrations of Mg^{2+} (0, 1, 3 and 5 mM), in order to evaluate the effects of Mg^{2+} on MSC immunomodulatory properties, cell proliferation rates, expression of NF κ B and STAT-3, production of IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-10, PGE2 and NO, and TRPM7 expression. The results showed that TRPM7 is expressed in MSCs, but Mg^{2+} , in the way that cells were cultivated, did not affect TRPM7 expression. Additionally, there was no difference in the intracellular concentration of Mg^{2+} . Mg^{2+} , especially at 5 mM, raised proliferation rates of MSCs, and modulated immune responses by decreasing levels of IL-1 β and IL-6, and by increasing levels of IL-10 and PGE2 in cells stimulated with LPS or TNF- α . In addition, MSCs cultured in 5 mM Mg^{2+} expressed lower levels of pNF κ B/NF κ B and higher levels of pSTAT-3/STAT-3. Furthermore, conditioned media from MSCs reduced lymphocyte and macrophage proliferation, but Mg^{2+} did not affect this parameter. In addition, conditioned media from MSCs cultured at 5 mM of Mg^{2+} modulated the production profile of cytokines, especially of IL-1 β and IL-6 in macrophages. In conclusion, Mg^{2+} is able to modulate some immunoregulatory properties of MSCs.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Magnesium; Mesenchymal stem cells; Macrophages and lymphocytes; Cytokines; Immunomodulation

Clinical Nutrition

Effects of dietary magnesium restriction on hematopoiesis trigger neutrophilia by mechanisms dependent on STAT-3, CEBP alpha and G-CSF

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	YCLNU-D-20-00162
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	magnesium; hematopoiesis; granulopoiesis; Granulocyte-colony stimulating factor
Corresponding Author:	Ricardo Fock, PhD University of Sao Paulo São Paulo, BRAZIL
First Author:	Fabiana da Silva Lima
Order of Authors:	Fabiana da Silva Lima Edson Naoto Makiyama Agatha Brides de Sousa Castelhana Araceli Aparecida Hastreiter Ricardo Fock, PhD
Abstract:	Background & aims: Magnesium (Mg^{2+}) is able to modulate the differentiation and proliferation of cells. Mg^{2+} restriction triggers neutrophilia, often associated with inflammation, but the mechanisms involved are not fully understood. Hematopoiesis is a complex process that is regulated by many factors, including cytokines and growth factors, and is strongly influenced by nutrient availability. In this context, our objective was to investigate the impact of the short-term restriction of dietary Mg^{2+} on bone marrow hematopoietic and peripheral blood cells, especially in processes related to granulocyte differentiation and proliferation. Methods: Male C57BL/6 mice were fed a Mg^{2+} restricted diet (50 mg Mg^{2+} /kg diet) for 4 weeks. Cell blood count and bone marrow cell count were evaluated. Bone marrow cells were also characterized by flow cytometry. Gene expression and cytokine production were evaluated, and a colony-forming cell assay related to granulocyte differentiation and proliferation was performed. Results: Short-term dietary restriction of Mg^{2+} resulted in peripheral neutrophilia associated with an increased number of granulocytic precursors in the bone marrow. Additionally, Mg^{2+} restriction resulted in an increased number of granulocytic colonies formed in vitro. Moreover, the Mg^{2+} restricted group showed increased expression of CSF3 and CEBP α genes as well as increased production of G-CSF in association with increased expression of STAT3 protein. Conclusion: Short-term dietary restriction of Mg^{2+} induces granulopoiesis by increasing G-CSF production and activating the CEBP α and STAT-3 pathways, resulting in neutrophilia in peripheral blood.
Opposed Reviewers:	