

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
TRANSPLANTE ALOGÊNICO EM CAMUNDONGOS
IMUNOCOMPETENTES**

Autor: Régis Linhares Oliveira

**Porto Alegre,
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
TRANSPLANTE ALOGÊNICO EM CAMUNDONGOS
IMUNOCOMPETENTES**

**Autor: Régis Linhares Oliveira
Orientadora: Patricia Pranke
Co-orientador: Pedro Cesar Chagastelles**

**Porto Alegre,
2015**

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) tem sido o foco de diversos estudos nos últimos anos, devido ao seu alto potencial terapêutico. Muitos estudos *in vitro* tem demonstrado que essas células podem ser hipoimunogênicas, indicando a possibilidade de uso dessas células em transplantes alogênicos sem nenhum efeito colateral. No entanto, estudos *in vivo* demonstram que as CTMs podem gerar uma resposta imune quando transplantadas em hospedeiros imunocompetentes, inclusive com a formação de células T de memória. Isto indica que possivelmente as CTMs não sejam imunoprivilegiadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de CTMs pré-ativadas e não ativadas, quando transplantadas sob a cápsula renal de camundongos imunocompetentes. Células mesenquimais derivadas do tecido adiposo foram coletadas de camundongos transgênicos C57Bl/6-GFP. As células foram então caracterizadas por ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica, assim como por imunofenotipagem, realizada por citometria de fluxo. Os animais foram divididos em três grupos para o transplante. No grupo singênico, machos C57Bl/6 receberam células C57Bl/6-GFP. Nos grupos alogênicos, camundongos BALB/c foram transplantados com células C57Bl/6-GFP ou células C57Bl/6-GFP pré-ativadas através da incubação com 20 ng/mL IFN- γ e 30 ng/mL TNF- α antes do transplante. A análise histológica e a imunofluorescência demonstraram que nenhum dos animais que receberam o transplante alogênico apresentou células GFP+ 28 dias após o transplante. Aos dias 7 e 14 os animais apresentaram grandes infiltrados de células inflamatórias no local. Aos 28 dias este infiltrado esteve reduzido ou inexistente, indicando completa rejeição das células transplantadas. Os animais que receberam o transplante singênico apresentaram células GFP+ 100 dias após o transplante. A quantificação de citocinas no plasma dos animais não demonstrou diferenças entre os grupos. Foi feito também um teste de proliferação de esplenócitos *in vitro*, co-cultivado com CTMs. O presente estudo demonstrou que as células alogênicas possuem a capacidade de provocar a proliferação dos esplenócitos, o que poderia explicar a rejeição ocorrida *in vivo*.

ABSTRACT

The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells (MSCs) have been the focus of several studies over the past few years due to their therapeutic potential. Many *in vitro* studies have shown that these cells can be hypoimmunogenic, indicating the possibility of using them in allogenic transplants without any harmful effects. However, recent *in vivo* studies show that these cells can generate an immune response when transplanted into an immunocompetent host, with the formation of memory T cells. This indicates that MSCs may not actually be immune privileged. The main goal of this study has been to evaluate the role of activated and non-activated MSCs when transplanted to the renal subcapsular space of allogenic mice. Adipose-derived mesenchymal stem cells were isolated from C57Bl/6-GFP transgenic mice. The cells were characterized by adipogenic and osteogenic differentiation assays and immunophenotyping was performed by flow cytometry. The animals were divided in three different groups for the transplant. Male C57Bl/6 mice were transplanted with C57Bl/6-GFP cells. In the allogenic groups, male BALB/c mice were transplanted with C57Bl/6-GFP cells or C57Bl/6-GFP cells pre-activated by incubation with 20 ng/mL IFN- γ and 30 ng/mL TNF- α for 20h before transplantation. Histological and immunofluorescence analysis of graft-bearing kidneys showed that no GFP+ cells were found in any allogenic transplant after 28 days. At 7 and 14 days, the transplant sites showed a massive proliferation of inflammatory cells, which vanished after 28 days, indicating complete rejection of the transplanted cells. The syngeneic transplant was not rejected, showing GFP+ cells through the whole period of study. Cytokine quantification in the blood plasma showed no difference between any of the groups. An *in vitro* splenocyte proliferation assay was performed, which indicates that MSCs alone can induce the activation of allogenic splenocytes. This could explain their rejection *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. **Efeitos imunomodulatórios das CTMs.** As CTMs (MSCs – do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) podem mediar efeitos imunomodulatórios interagindo tanto com células do sistema imune inato (células dendríticas - 2,3 e 4; assim como células NK - 6) quanto do sistema imune adaptativo (células T - 1 e 5). A inibição do TNF- α e a liberação de IL-10 provocadas pelas CTMs pode afetar o estado de maturação e as propriedades funcionais das células dendríticas, resultando em um balanço favorável para a tolerância imunológica. Quando presentes em um microambiente inflamatório, as CTMs inibem a secreção de IFN- γ pelas células Th1 e NK, além de provocar a secreção de IL-4 por células Th2, provocando uma troca de resposta pró-inflamatória de células Th1 para anti-inflamatória de células Th2. CCL: ligante de quimiocinas; TCR: receptor de células T. (AGGARWAL; PITTEGER, 2005).

Figura 2. **Vias de alorreconhecimento.** Na via direta a molécula de MHC do doador é reconhecida pela célula T do receptor. Na rota indireta, os peptídeos das moléculas de MHC do doador são apresentados às células T pelas moléculas de MHC presentes nas APCs dos receptores. (ARIAS; LÓPEZ-VÁZQUEZ; LÓPEZ-LARREA, 2012).

Figura 3. **Modulação das células envolvidas na resposta imune mediada por CTMs.** A interação bidirecional entre as CTMs (MSCs), células T, células B, células NK. A influência de células dendríticas nas CTMs ainda não foi comprovada. Os efeitos causados pelas células imunes nas CTMs está em vermelho e o inverso está em preto. (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2006)

Figura 4. **Caracterização das CTMs.** (A) Imagens de culturas de células-tronco mesenquimais e diferenciadas por 3-4 semanas em meios de diferenciação adipogênico e osteogênico, coradas com Oil Red O e Alizarin Red S, respectivamente. Aumento de 200x. (B) Presença dos marcadores CD11b, -CD34, -CD44, -CD45, -CD90.2 e -Sca-1 nas CTMs, analisada por citometria de fluxo (n=2).

Figura 5. **Teste de viabilidade celular após a pré-ativação das células-tronco mesenquimais (CTMs).** Média das frequências de células mortas no grupo pré-ativado com IFN- γ e TNF- α por 20h e no grupo não ativado, após 24 e 96 horas de incubação (n=3). * P <0,05. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

Figura 6. **Análise da expressão de MHC classe II em células-tronco mesenquimais.** Histogramas mostrando a expressão de MHC classe II em uma linhagem de CTM antes (linha preta) e após (cinza) a ativação com IFN- γ e TNF- α por 20h. (A) Após 24h da ativação ocorreu um aumento da expressão de MHC classe II pelas CTMs. (B) Após 96h da ativação, não houve aumento da expressão de MHC II.

Figura 7. **Expressão de MHC classe II.** Média das frequências de células positivas para MHC classe II em células ativadas e não ativadas após 24 e 96 horas da ativação (n=3). * P <0,05. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

Figura 8. **Análise da proliferação de esplenócitos em co-cultivo com diferentes concentrações de CTMs.** Não houve diferença significativa entre as diferentes proporções de células e esplenócitos (1:4 e 1:10). Houve diferença significativa entre os grupos alogênico (n=5) e singênico (n=3). * P <0,01. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

Figura 9. **Análise da proliferação de esplenócitos em co-cultivo com CTMs singênicas e alogênicas pré-ativadas e não ativadas.** O índice de estimulação foi calculado através da razão entre as absorbâncias das CTMs em co-cultivo com os esplenócitos e dos esplenócitos sozinhos. ab: houve diferença estatística entre os grupos alogênico (n=5) e singênico (n=3), assim como entre as células ativadas e não ativadas (a e b). P <0,01. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

Figura 10. **Análise da ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em co-cultivo com diferentes concentrações de CTMs, após 72h de incubação.** Os linfócitos foram marcados para CD4 e CD69 (A) ou para CD8 e CD69 (B). Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA de duas vias.

Figura 11. **Análise histológica por coloração com H&E dos rins transplantados com células-tronco mesenquimais nos diferentes grupos.** (A) Alogênico 7 dias, (B) Alogênico + CTMs ativadas 7 dias, (C) Alogênico 14 dias, (D) Alogênico + CTMs ativadas 14 dias, (E) Alogênico 28 dias, (F) Alogênico + CTMs ativadas 28 dias, (G) Singênico 28 dias e (H) Singênico 100 dias. Aumento de 100x.

Figura 12. **Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-GFP dos rins transplantados com CTMs.** (A) e (B) Grupo alogênico 7 dias após o transplante marcado para DAPI e GFP+, respectivamente. (C) e (D) Alogênico 14 dias após o transplante. (E) e (F) Alogênico + CTMs ativadas 14 dias após o transplante. (G) e (H) Alogênico 28 dias após o transplante com CTMs. (I) e (J) Alogênico 28 dias após o transplante com CTMs ativadas. (K) e (L) Singênico 100 dias após o transplante. Aumento de 200x

Figura 13. **Sobrevida das células transplantadas nos diferentes grupos experimentais.** Medida através da frequência de rins contendo células positivas para GFP após análise por imunofluorescência. * $P < 0,001$. Teste de Mantel-Cox Log-Rank.

Figura 14. **Quantificação das citocinas no plasma dos animais transplantados nos determinados tempos após o transplante.** O plasma de animais não transplantados foi utilizado como controle. Não houve diferença significativa entre os grupos ($n = 2$ a 5). ANOVA de uma via.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Células-tronco Mesenquimais	10
1.2	Mecanismos de rejeição	14
1.3	CTMs e estudos <i>in vivo</i>	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos específicos:	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Animais	21
3.2	Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais.....	21
3.3	Diferenciação celular.....	22
3.4	Citometria de fluxo.....	22
3.5	Viabilidade das células ativadas e não ativadas	23
3.6	Expressão de antígenos MHC classe II das células ativadas e não ativadas	23
3.7	Análise de proliferação de esplenócitos em co-cultivo com CTMs	24
3.8	Análise da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ em co-cultivo com CTMs	24
3.9	Transplante de CTMs	25
3.10	Histologia	26
3.11	Imunofluorescência	27
3.12	BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	27
3.13	Descarte de resíduos.....	28
3.14	Biossegurança	28
3.15	Análise estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Caracterização celular	29
4.2	Expressão de MHCII e viabilidade de células ativadas e não ativadas	30
4.3	Análise de proliferação de esplenócitos em co-cultivo com CTMs	33
4.4	Análise da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ em co-cultivo com CTMs	34
4.5	Transplantes	36
4.6	Análises histológicas	36
4.7	BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	41
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) apresentam capacidade ilimitada ou prolongada de auto-renovação, originando células indiferenciadas com as mesmas características, bem como são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares especializados. As CT são classificadas de acordo com a sua origem como células-tronco pluripotentes (CTPs) e células-tronco adultas (CTAs). As CTPs compreendem as CT embrionárias (CTEs) e as células-tronco pluripotentes induzidas (chamadas iPS cells ou iPSCs – do inglês *induced pluripotent stem cells*). As CTEs são isoladas da massa celular interna do blastocisto e apresentam como característica a pluripotência, podendo se diferenciar em todas as células especializadas do organismo. As iPSCs são um tipo de CTPs que pode ser gerada diretamente de células adultas, através da introdução de quatro genes específicos que codificam fatores de transcrição capazes de converter células adultas em CTPs (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Essa descoberta rendeu o prêmio Nobel, em 2012, para o grupo de Yamanaka juntamente com o grupo de Sir John Gurdon (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/; consultado em 18/02/2015).

Dentre as CTAs, as células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido vastamente estudadas visando a sua aplicação terapêutica devido a sua facilidade de obtenção, podendo ser isoladas de locais como a medula óssea, a polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000), o tecido adiposo (ZUK et al., 2001) e o cordão umbilical (SECCO et al., 2008), entre outros. Estudos demonstram que essas células podem ser isoladas de qualquer tecido vascularizado, por residirem na região perivascular (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

1.1 Células-tronco Mesenquimais

As CTMs foram inicialmente descritas como precursores de fibroblastos por Friedenstein, em 1970. A técnica utilizada por esse pesquisador baseava-se na característica de aderência à placa de cultura que essas células possuem. Dessa maneira, era possível separar as células aderentes da medula óssea em placas de cultura plásticas e descartar as células não aderentes através de trocas do meio de cultivo. As células que se mantinham na placa, apresentavam-se fusiformes, semelhantes a fibroblastos e com capacidade de se multiplicar rapidamente *in vitro* após alguns dias em cultivo (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; K.S.LALYKINA, 1970).

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular decidiu estabelecer os critérios mínimos para caracterizar as CTMs humanas, tendo em vista que dependendo do tecido isolado, do doador e dos protocolos utilizados, estas culturas poderiam ter um fenótipo muito heterogêneo. Esses critérios são utilizados até hoje e incluem, além de sua morfologia e aderência ao placa de cultura, o seu potencial de diferenciação em células da linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica, bem como a presença dos marcadores de superfície CD90, CD105 e CD73 e ausência dos marcadores de células hematopoéticas tais como CD45, CD34, CD11b ou CD14, CD79 α ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006).

A função *in vivo* das CTMs ainda não é completamente conhecida. No entanto, acredita-se que elas possuam um papel importante na manutenção da homeostase tecidual. Essas células apresentam a capacidade de se diferenciar *in vitro* em células derivadas da linhagem mesenquimal, tais como adipócitos, osteoblastos e condrócitos (KRAMPERA et al., 2003; DOMINICI et al., 2006; MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006). Porém, o papel nos processos de reparo e regeneração, em muitos casos, parece não ser atribuído à diferenciação em células do tecido onde as CTMs se

encontram ou foram implantadas, mas sim ao efeito parácrino exercido por essas células. As CTMs são capazes de secretar moléculas antiapoptóticas, neoangiogênicas, pró-mitóticas, bem como atuarem sobre as células do sistema imune, apresentando um importante papel imunossupressor (ORTIZ, L. A. et al., 2003; NAGAYA et al., 2004; FRANÇOIS et al., 2012; MELIEF et al., 2013).

Estudos *in vitro* demonstram que as CTMs possuem a capacidade de secretar diversas citocinas e fatores de crescimento que suprimem a resposta imune através da inibição da proliferação de linfócitos B e T, assim como a maturação de monócitos. Além disso, essas células são capazes de promover a geração de células T regulatórias e macrófagos M2 (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

Foram demonstradas que as moléculas secretadas por CTMs apresentam a capacidade de modular a resposta imune através da alteração do padrão de secreção de citocinas, favorecendo a liberação de substâncias anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e inibindo citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (DI NICOLA et al., 2002; AGGARWAL; PITTINGER, 2005; WATERMAN et al., 2010; MARIGO; DAZZI, 2011). Esses possíveis mecanismos imunomodulatórios estão representados na Figura 1.

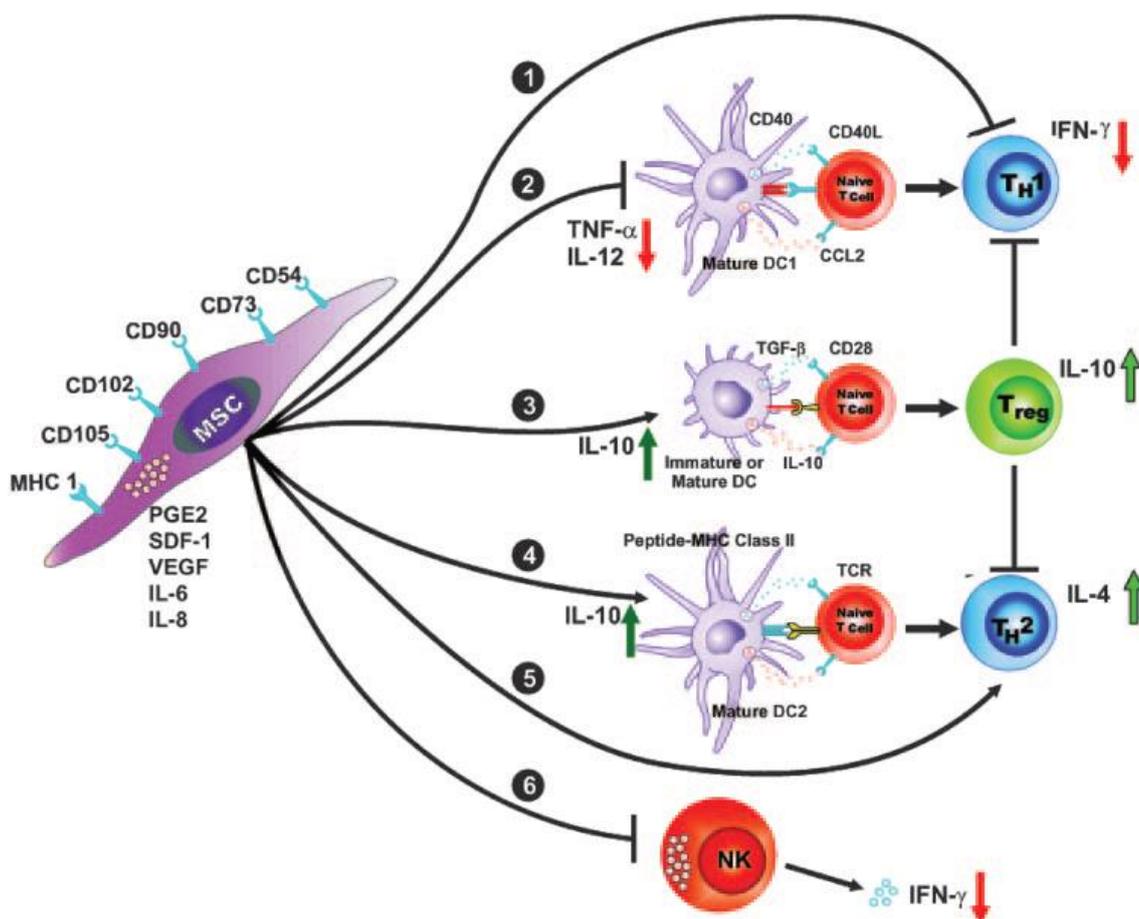


Figura 1. Efeitos imunomodulatórios das CTMs. As CTMs (MSCs – do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) podem mediar efeitos imunomodulatórios interagindo tanto com células do sistema imune inato (células dendríticas – (2), (3) e (4)); assim como células NK – (6)) quanto do sistema imune adaptativo (células T – (1) e (5)). A inibição do TNF- α e a liberação de IL-10 provocadas pelas CTMs pode afetar o estado de maturação e as propriedades funcionais das células dendríticas, resultando em um balanço favorável para a tolerância imunológica. Quando presentes em um microambiente inflamatório, as CTMs inibem a secreção de IFN- γ pelas células Th1 e NK, além de provocar a secreção de IL-4 por células Th2, provocando uma troca de resposta pró-inflamatória de células Th1 para anti-inflamatória de células Th2. CCL: ligante de quimiocinas; TCR: receptor de células T. (AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

As descobertas citadas anteriormente levaram a uma mudança de paradigma quanto à utilização das CTMs. Os estudos clínicos, antes focados na diferenciação celular para regeneração de tecidos, principalmente nos casos de fraturas, osteogênese imperfeita e fusão espinhal, passaram a focar na habilidade dessas células de secretar citocinas, que podem exercer suas funções biológicas tanto de maneira parácrina quanto endócrina. A mudança levou a um crescimento significativo na quantidade de estudos clínicos para tratar doenças como infarto do miocárdio (SCHULERI et al., 2009), doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (BLANC et al., 2008), doenças pulmonares crônicas (ORTIZ, LUIS A. et al., 2007), doenças renais (KUNTER et al., 2006), diabetes (LEE et al., 2006), entre outras.

A maioria dos pacientes envolvidos nestes estudos receberam células alogênicas, levando ao aparecimento da hipótese de que estas células poderiam ser imunoprivilegiadas, podendo assim ser utilizadas em transplantes sem a necessidade de testes para avaliar a compatibilidade do MHC do doador e do receptor (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

A possibilidade de aplicação de CTMs alogênicas tornou-se uma alternativa interessante devido a diversos fatores. O primeiro deles seria a possibilidade de criação de bancos de CTMs para aplicação clínica, sem a necessidade de se retirar as células do próprio paciente. Esse fato possibilitaria a aplicação imediata das células em pacientes em casos agudos, onde é importante o transplante das células tão logo a lesão ocorra. Outra vantagem do uso de CTMs alogênicas está relacionada à facilidade de utilização em lugares onde não há infra-estrutura necessária para o isolamento e expansão dessas células, que deve obedecer as boas práticas de manufatura (cGMP, do inglês *current Good Manufacturing Practices*).

1.2 Mecanismos de rejeição

Alorreconhecimento é o termo utilizado para definir o reconhecimento imunológico a antígenos histoincompatíveis entre indivíduos da mesma espécie, porém com genéticas diferentes. Esse alorreconhecimento vai levar ao início de uma resposta imune adaptativa, com recrutamento de células T (AFZALI; LOMBARDI; LECHLER, 2008).

Os linfócitos T são o centro das respostas tanto efectoras quanto regulatórias aos aloantígenos e podem reconhecê-los de duas maneiras principais: as vias direta e indireta. A via direta consiste no reconhecimento de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - do inglês *major histocompatibility complex*) intacto das células apresentadoras de antígeno (APCs - do inglês *antigen presenting cells*) do doador. O MHC é dividido em classes I e II. As moléculas de MHC-I são encontradas em todas as células nucleadas e ligam-se apenas aos linfócitos T CD8+. O MHC-II, expresso apenas nas APCs, interage com linfócito T CD4+, apresentando papel principal na rejeição de um transplante (ARIAS; LÓPEZ-VÁZQUEZ; LÓPEZ-LARREA, 2012) Na via indireta de reconhecimento de antígenos, as APCs do receptor processam os antígenos derivados das moléculas de MHC do doador e os apresentam aos linfócitos T do receptor. As células T virgens recebem os sinais ainda no tecido linfóide e se ativam, transformando-se em linfócitos T efetores, que se dirigem diretamente para o enxerto, levando a rejeição aguda do transplante (LAROSA; RAHMAN; TURKA, 2007). A figura 2 mostra, de maneira esquemática, as duas vias de alorreconhecimento.

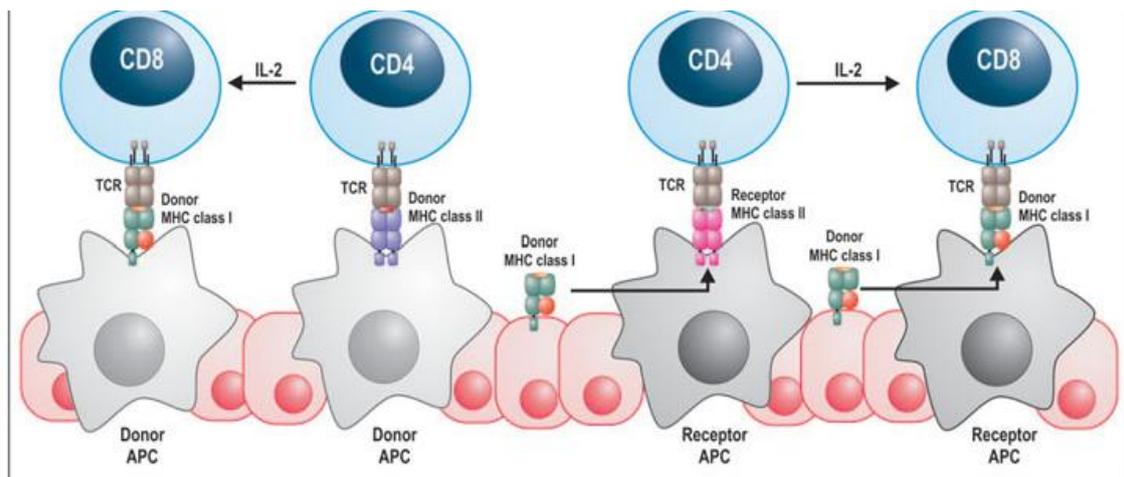


Figura 2. Vias de alorreconhecimento. Na via direta a molécula do MHC do doador é reconhecida pela célula T do receptor. Na rota indireta, os peptídeos das moléculas do MHC do doador são apresentados às células T pelas moléculas do MHC presentes nas APCs dos receptores. (ARIAS; LÓPEZ-VÁZQUEZ; LÓPEZ-LARREA, 2012).

A resposta imune inata também desempenha um importante papel na rejeição aguda e crônica de um transplante. A resposta proveniente do sistema imune inato pode ser decorrente de diversos fatores durante o transplante, como dano por reperfusão, inflamação, dano tecidual e até infecção bacteriana (BENICHOU et al., 2012). As células desse sistema podem contribuir de maneira direta, via secreção de fatores solúveis e destruição das células do doador, ou indireta, iniciando ou aumentando a resposta imune adaptativa. Diversos estudos demonstram que as células *natural killer* (NK) possuem um papel essencial na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (UEHARA et al., 2005; ROY et al., 2008; YOSHIDA et al., 2008). Essas células se tornam ativadas em contato com moléculas MHC de classe I de células alogênicas, levando à destruição das células transplantadas e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α (MAIER et al., 2001).

Diversos estudos indicam que as CTMs possuem baixos níveis de moléculas MHC de classe I e falta de moléculas MHC de classe II (POTIAN et al., 2003; ELIOPOULOS et al., 2005; SHENG et al., 2008). Além disso, dados da literatura sugerem que as CTMs podem suprimir a ativação e proliferação de diversos tipos de células imunes, como linfócitos T e B, células NK e APCs (Figura 3) (MEISEL et al., 2004; NAUTA, A. J. et al., 2006; SPAGGIARI et al., 2006; RASMUSSEN et al., 2007). Essa supressão não necessita do contato direto entre as células (KRAMPERA et al., 2006) e ocorre provavelmente pela secreção de citocinas, incluindo a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), o principal mecanismo inibitório de células T durante a interação APC/célula T em humanos, e prostaglandina E (PGE₂) (MEISEL et al., 2004; AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Em camundongos, o papel principal na inibição da proliferação de células T pelas CTMs parece pertencer ao óxido nítrico (NO) (SATO et al., 2007), molécula que parece não estar envolvida na imunomodulação de CTMs humanas (REN et al., 2009).

Foi demonstrado que a ativação das CTMs humanas com IFN- γ pode promover um aumento da capacidade imunossupressora dessas células por estimular a atividade da IDO (MEISEL et al., 2004), assim como de PGE₂ (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Esse aumento na capacidade imunossupressora, embora tenha sido maior com doses mais altas de IFN- γ , foi significativo em doses baixas, geradas fisiologicamente por células T em reações alogênicas. Isto indica que a própria reação imune poderia ativar as CTMs, aumentando assim sua capacidade imunossupressora. English e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação das CTMs utilizando IFN- γ e TNF- α provocou uma melhora na capacidade imunomodulatória dessas células, especialmente pelo aumento da expressão de COX-2, enzima envolvida na produção da PGE₂.

Estudos realizados em camundongos, a indução da molécula efetora NO só ocorreu na presença de IFN- γ e TNF- α ou IL-1, sendo portanto o IFN- γ insuficiente para aumentar a capacidade imunossupressora das CTMs murinas sozinho (REN et al., 2009). Esses dados sugerem que as CTMs podem suprimir a resposta imune exacerbada, mantendo a homeostase do sistema imune através de interações físicas ou químicas com células inflamatórias, promovendo tolerância às células alogênicas, particularmente a si mesmas (NAUTA, ALMA J.; FIBBE, 2007).

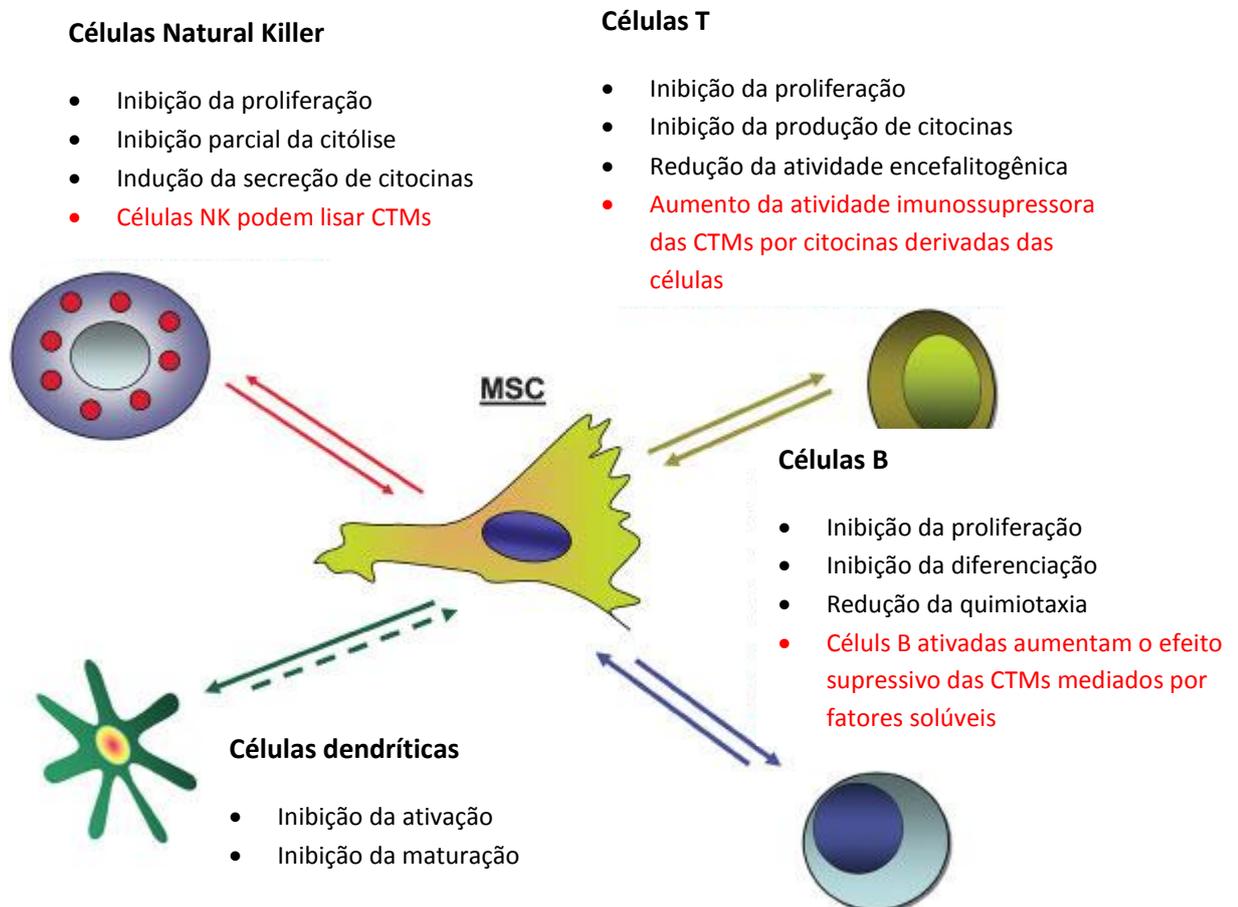


Figura 3. Modulação das células envolvidas na resposta imune mediada por CTMs. Descrição da interação bidirecional entre as CTMs, células T, células B, células NK. A influência de células dendríticas nas CTMs ainda não foi comprovada. Os efeitos

causados pelas células imunes nas CTMs estão em vermelho e o inverso está em preto. (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2006)

1.3 CTMs e estudos *in vivo*

Apesar da suposta capacidade imunossupressora *in vitro*, não estaria claro se as CTMs alogênicas ou xenogênicas seriam capazes de escapar do ataque de células imunes quando transplantadas, uma vez que os estudos realizados *in vivo*, até o momento, apresentam resultados conflitantes (ANKRUM; ONG; KARP, 2014), conforme pode ser observado com os estudos citados a seguir.

Em 2002, Bartholomew e colaboradores demonstraram que a adição de CTMs de babuíno à cultura de leucócitos do sangue periférico, estimulados com mitógenos, provocou uma redução na proliferação desses leucócitos de maneira dose-dependente. Essa supressão ocorreu tanto na utilização de CTMs autólogas quanto alogênicas. Após a remoção das células, os leucócitos voltaram a responder normalmente aos estímulos mitogênicos. Além disso, quando administradas por via intravenosa, as CTMs aumentaram a permanência de um enxerto de pele alogênico nos animais, passando de sete para onze dias.

Desde então, diversos estudos vêm demonstrando que as CTMs podem promover a tolerância a outros tecidos transplantados, incluindo ilhotas pancreáticas e aloenxertos cardíacos (CASIRAGHI et al., 2008; FIGLIUZZI et al., 2014). Esse processo parece ocorrer mesmo quando as células são utilizadas em pacientes com MHC diferente (BARTHOLOMEW; et al., 2002). Entretanto, ainda não foi demonstrada nenhuma tolerância específica às CTMs em transplantes alogênicos (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

Outro estudo relata a sobrevivência de CTMs por mais de quatro semanas após o transplante em lesões intracranianas de ratos. Entretanto, o cérebro é considerado um local imunoprivilegiado e não representa a resposta imune como ocorre em outros órgãos e tecidos do organismo (CAMP *et al.*, 2009). Da mesma forma, demonstrou-se que a aplicação de CTMs da medula óssea não apresentou diferenças no número de células no local da lesão ou na capacidade de regeneração do tecido danificado, quando utilizado modelo singênico e alogênico de lesão de pele em camundongos (CHEN *et al.*, 2009).

No entanto, resultados de estudos vêm demonstrando a redução da sobrevivência das células alogênicas, com relação às autólogas, em camundongos transplantados pela via subcutânea, com presença aumentada em linfócitos T citotóxicos e células NK no local, após 15 dias do transplante (ELIOPOULOS *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Zangi e colaboradores (2009), quando CTMs foram transplantadas pela via intraperitoneal. Ambos os estudos mostraram que o transplante de células alogênicas foi capaz de levar à produção de células de memória.

Essa diversidade de resultados torna necessário um estudo mais aprofundado da biologia das CTMs, para que se possa entender os mecanismos de ação dessas células no sistema imune, especialmente *in vivo*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de células-tronco mesenquimais alogênicas e singênicas quando transplantadas sob a cápsula renal de camundongos imunocompetentes.

2.1 Objetivos específicos:

- 1) Realizar a caracterização das células-tronco mesenquimais *in vitro*.
- 2) Avaliar a capacidade das CTMs em reduzir a proliferação de esplenócitos *in vitro*.
- 3) Avaliar a sobrevivência das CTMs não-ativadas e pré-ativadas com IFN- γ e TNF- α em diferentes períodos pós-transplante.
- 4) Avaliar a presença de infiltrados celulares no transplante e especificamente de células do sistema imune.
- 5) Avaliar os níveis de citocinas relacionadas pró- e anti-inflamatórias no soro dos animais, nos diferentes períodos pós-transplante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Um total de 43 camundongos machos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c foram utilizados nos experimentos, obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), bem como três animais C57Bl/6 transgênicos para o gene repórter GFP (FM131, Osaka University, Japan), todos com doze semanas de idade. Os animais foram mantidos sob condições padrão, com água e comida *ad libidum* no biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os camundongos transgênicos foram adquiridos de um biotério externo e foram mortos para a coleta das células logo após a chegada. As atividades realizadas com os organismos geneticamente modificados do grupo 1 de risco biológico foram autorizadas conforme o Ofício CIBio/UFRGS 03/2013. O manejo dos animais foi realizado de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) no dia 4 de outubro de 2013, sob o número 24708.

3.2 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

A gordura subcutânea dos camundongos foi coletada de maneira asséptica logo após a morte por deslocamento cervical e transferida para uma placa de Petri estéril. O material biológico foi cortado em pequenos fragmentos para então serem digeridos com 1 mg/mL de colagenase tipo I (Gibco), diluída em meio Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) sem soro, durante 45 minutos. Para inativar a enzima, foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,1mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram centrifugadas a 300xg por 10 minutos para posteriormente serem ressuspensas em meio suplementado e plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24h, o meio foi trocado e as culturas celulares tripsinizadas com solução de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco) quando confluentes. Subsequentemente, as passagens celulares foram realizadas para a

continuidade da expansão cultura. As células foram utilizadas no experimento quando atingiram a quarta passagem.

3.3 Diferenciação celular

As CTMs foram transferidas para uma placa de 12 poços e, quando confluentes, induzidas com os meios de diferenciação específicos. A diferenciação osteogênica foi realizada utilizando meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de β -glicerofosfato, 5 μ g/mL de solução de ácido ascórbico 2-fosfato. No momento da utilização, foi acrescentado dexametasona na concentração final de 10^{-8} M. O meio de diferenciação adipogênico foi composto por meio DMEM adicionado de 20% de soro fetal bovino, 10^{-8} M de dexametasona, 2,5 μ g/mL de insulina de pâncreas bovino, 100 μ M de indometacina e 5 μ M de rosiglitazona. Todos os indutores de diferenciação utilizados foram da Sigma-Aldrich. O meio suplementado sem os indutores foi utilizado como controle negativo.

As trocas de meio foram realizadas duas vezes por semana e após 30 dias do início da diferenciação as células foram lavadas com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas. O corante Oil Red O foi utilizado nas para corar os vacúolos lipídicos e Alizarin Red S para colorir a matriz de cálcio.

Após a revelação, as células foram analisadas em um microscópio Nikon invertido, com contraste de fase e fluorescência, e as fotos tiradas utilizando aumento de 200x.

3.4 Citometria de fluxo

A imunofenotipagem das CTMs foi realizada pela incubação das células com anticorpos anti-CD11b, -CD34, -CD44, -CD45, -CD90.2 e -Sca-1 conjugados com fluorocromo ficoeritrina (PE - do inglês *phycoerythrin*). Após a tripsinização, as células foram ressuspensas na concentração de 10^6 células/mL, em solução tamponada de fosfato (PBS), e 10^5 células foram incubadas com 4 μ L de cada anticorpo por 30 min a

4° C, assim como o controle isotópico adequado. Após, as células foram lavadas com PBS para remover o excesso de anticorpos não ligados. A análise foi feita em um citômetro de fluxo (FACSAria III, Becton Dickinson), e os gráficos gerados no programa WinMDI, versão 9.2.

3.5 Viabilidade das células ativadas e não ativadas

As células na quarta passagem foram tripsinizadas e passadas para placas de seis poços. Após atingirem a confluência, o grupo das células pré-ativadas foi incubado com 20 ng/mL IFN- γ e 30 ng/mL TNF- α por 20 horas. Em seguida, retirou-se o meio contendo os fatores de ativação, foi feita uma lavagem com PBS 1X e adicionado o meio suplementado apenas com soro fetal bovino e antibiótico. O grupo controle foi mantido em meio suplementado durante todo o tempo. As análises foram realizadas, por citometria de fluxo, 24 e 96 horas após a pré-ativação.

Para avaliação da viabilidade as células, as mesmas foram tripsinizadas, lavadas com PBS 1X e incubadas com 5 μ L de iodeto de propídeo (50 μ g/mL) por cinco minutos. Em seguida, as células foram lavadas e centrifugadas para remover o excesso do reagente. As CTMs foram ressuspensas em PBS 1X e analisadas no citômetro de fluxo, utilizando o iodeto de propídeo (PI – do inglês *propidium iodide*) para marcar células mortas. Os dados foram analisados no programa FACSDiva 6.0.

3.6 Expressão de antígenos MHC classe II das células ativadas e não ativadas

As células foram tripsinizadas, plaqueadas e ativadas da mesma maneira descrita no experimento anterior. A avaliação da expressão de moléculas MHC classe II foi realizada utilizando o anticorpo anti-camundongo de MHC classe II (clone M5, Life Technologies) conjugado com aloficocianina (APC – do inglês *allophycocyanin*) por 30 minutos, assim como com seu controle isotópico. Em seguida, foi realizada uma lavagem e centrifugação para remover o excesso de anticorpo não ligado. As células foram ressuspensas em PBS 1X e analisadas no citômetro de fluxo. Os dados foram analisados no programa FACSDiva 6.0.

3.7 Análise de proliferação de esplenócitos em co-cultivo com CTMs

As CTMs das linhagens Balb/c e C57BL/6 foram incubadas com 10 µg/mL de mitomicina C por 3 horas para cessar a proliferação celular quando atingiram a quarta passagem. Após, as células foram ativadas com IFN- γ e TNF- α , como descrito anteriormente, e passadas para placas de 96 poços em duas concentrações diferentes, 10^4 células e $2,5 \times 10^4$ células e deixadas *overnight* para aderir à placa. No dia seguinte, esplenócitos de camundongos Balb/c foram coletados de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Após a anestesia, os animais foram mortos por deslocamento cervical e o baço foi retirado e colocado em uma placa de *Petry*. Os esplenócitos foram retirados e mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2-Mercaptoethanol (55mM) e GlutaMAX™ Supplement (200 mM). O material foi centrifugado (300xg por 7 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de solução de cloreto de amônia 0,8% e incubado a 4°C por 5 minutos para lisar as hemácias. Para parar a reação, adicionou-se PBS 1X. As células foram centrifugadas novamente e os esplenócitos foram plaqueados em placas de 96 poços (5×10^5 células/poço). Após 72 horas, as células foram fixadas para análise com o BrdU Cell Proliferation Kit (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. O reagente BrdU foi adicionado ao meio de cultura 20h antes da fixação. A absorbância das amostras foi analisada no SpectraMax 190 Microplate Reader em um comprimento de onda de 450nm.

3.8 Análise da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ em co-cultivo com CTMs

As CTMs de camundongos Balb/c e C57BL/6 foram preparadas da mesma maneira descrita no experimento anterior e, após a ativação, foram colocadas em placas de 12 poços em duas concentrações diferentes (5×10^4 células e $1,25 \times 10^5$ células) e deixadas *overnight* para aderir à placa. No dia seguinte, os esplenócitos de camundongos Balb/c foram coletados e colocados em co-cultivo com as CTMs. Após 72 horas, as células não aderentes foram coletadas da placa e incubadas com os

anticorpos da seguinte maneira: anti-CD4 conjugado com FITC e anti-CD69 conjugado com PE, ou anti-CD8 conjugado com FITC (do inglês - *fluorescein isothiocyanate*) e anti-CD69, para avaliar a ativação de cada um dos tipos de linfócitos T. Os dados foram analisados no programa FACSDiva 6.0.

3.9 Transplante de CTMs

Após atingirem a quarta passagem, as células foram tripsinizadas e uma alíquota foi retirada para fazer a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer com coloração por Azul Tripán. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300xg por 10 minutos para obtenção de um precipitado para o transplante. O volume do precipitado foi determinado para calcular a quantidade de células, de modo que cada animal recebesse 2×10^5 células. Os animais foram separados em três grupos:

Grupo 1. Transplante singênico – Transplante de 2×10^5 CTMs oriundas do tecido adiposo de camundongos C57Bl/6 GFP+ em camundongos C57Bl/6 (n=8).

Grupo 2. Transplante alogênico – Transplante de 2×10^5 CTMs oriundas do tecido adiposo de camundongos C57Bl/6 GFP+ em camundongos BALB/c (n=16).

Grupo 3. Transplante alogênico - Transplante de 2×10^5 CTMs oriundas de tecido adiposo de camundongos C57Bl/6 GFP+ pré-ativadas com IFN- γ e TNF- α em camundongos BALB/c (n=16).

Para a pré-ativação das células, as culturas foram incubadas com 20 ng/mL de IFN- γ e 30 ng/mL de TNF- α por 20 horas antes do transplante. Após a ativação, as células foram tripsinizadas e preparadas para o procedimento cirúrgico.

Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 0,2 mL de solução salina contendo cetamina e xilazina, nas doses 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Após a perda de consciência e a realização da antisepsia adequada do campo cirúrgico, a laparotomia pelo flanco esquerdo foi empregada para a exposição do rim. Em seguida,

realizou-se uma incisão na cápsula renal e as células foram implantadas no espaço subcapsular, com auxílio de um tubo de polietileno PE50 acoplado a uma seringa Hamilton. A abertura da cápsula renal foi cauterizada e o rim reposicionado na cavidade abdominal. A sutura da cavidade abdominal foi feita com fio de nylon 6-0. Os animais permaneceram em placa térmica até o retorno da consciência para evitar a hipotermia e receberam 0,2 mL de solução salina contendo 3 mg/kg de butorfanol para proporcionar a analgesia pós-operatória adequada.

Após o transplante, os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia, sob as condições descritas anteriormente. Nos dias 7, 14, 28 e 100 os animais foram anestesiados novamente para a coleta de sangue, por punção intracardíaca e mortos por deslocamento cervical. Os rins transplantados foram removidos, fixados em formalina tamponada 10% por 12h e criopreservados em sacarose 30% por 24h a 4° C. Após a criopreservação, os órgãos foram colocados em meio de congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ e cortados em criostato a -20° C. Após o corte, as lâminas foram mantidas em freezer -20° C. Foram utilizadas duas espessuras de corte diferentes (5 e 10µm) para verificar a ocorrência de rejeição contra as células transplantadas através das análises histológicas e imunofluorescência.

3.10 Histologia

A avaliação dos infiltrados inflamatórios e da presença de células no local do transplante foi realizada através da coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por cinco minutos, lavadas em água corrente e diferenciadas com álcool 70% com 1% de HCl. Após a segunda lavagem, as lâminas ficaram em contato com a eosina por cinco minutos e foram lavadas com água corrente novamente. Em seguida, realizou-se a desidratação utilizando álcool 95% e 100% por cinco minutos com cada concentração. Após cinco minutos em xileno, as lâminas foram montadas utilizando meio DPX e avaliadas em microscópio Nikon invertido. As fotos foram obtidas em aumento de 200 vezes.

3.11 Imunofluorescência

Para a detecção das células nos cortes, as lâminas passaram pelo processo de marcação com anticorpo anti-GFP (A11122, Invitrogen). Realizou-se o bloqueio e permeabilização do tecido com solução de PBS 1X contendo 1% de BSA e 0,1% de Triton X-100 por 30 min. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo anti-GFP diluído na solução de bloqueio descrita acima na proporção 1:500 durante uma hora a temperatura ambiente. Um dos cortes de cada lâmina foi utilizado como controle negativo, não recebendo o anticorpo primário. Após a lavagem com PBS, realizou-se a incubação com o anticorpo Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG (1:300 diluído em PBS 1X) por 30 minutos. O núcleo das células foi marcado através da incubação com 5 µg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante cinco minutos. As lâminas foram lavadas e as lamínulas colocadas para a avaliação no microscópio de fluorescência. A rejeição do transplante foi evidenciada pela ausência de células GFP+ nos rins analisados.

3.12 BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA)

O sangue coletado dos animais foi centrifugado a 1600xg por 10 minutos e o plasma coletado e armazenado a -80°C para análise posterior. O plasma de animais não transplantados, das linhagens Balb/c e C57BL/6, também foi coletado para análise. Esses animais foram considerados como grupo controle para esse experimento. A quantificação das citocinas interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interferon- γ , fator de necrose tumoral, interleucina-17A e interleucina-10 foi realizada utilizando-se o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* de acordo com as instruções do fabricante. A citometria foi realizada utilizando-se equipamento BD FACSAria III (BD Biosciences) com lasers de 488 e 633 nm. Os dados foram analisados no software FCAP Array: version 3 da Soft Flow Inc.

3.13 Descarte de resíduos

Os resíduos biológicos, incluindo as carcaças dos animais, foram acondicionados em sacos plásticos brancos específicos, os quais contêm a indicação gráfica da presença desse tipo de resíduo e foram depositados em um *freezer* destinado especialmente para esse fim, no próprio Laboratório de Células-tronco do ICBS. Os materiais plásticos, contaminados somente com resíduos biológicos (luvas, microtubos, ponteiras) foram acondicionados em sacos brancos semelhantes aos anteriormente descritos ao final de cada experimento. A coleta foi realizada por uma empresa terceirizada nesse tipo de coleta, serviço oferecido pela própria Universidade.

Os resíduos químicos foram acondicionados de maneira apropriada e a coleta realizada por uma empresa terceirizada, serviço oferecido também pela Universidade.

3.14 Biossegurança

Todos os procedimentos foram realizados com o uso de equipamentos de proteção individual como jalecos, luvas e capelas de fluxo laminar para minimizar os riscos inerentes às atividades de pesquisa.

3.15 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o software SigmaPlot 12.0 e os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism 6.

A comparação das médias foi realizada por análise de (ANOVA de duas vias) seguida do teste de post-hoc de Tukey. O nível de significância adotado no estudo foi de 5% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização celular

A análise da capacidade de diferenciação das culturas de CTMs isoladas de tecido adiposo demonstrou que essas células possuem potencial de diferenciação adipogênica, apresentando, após trinta dias no meio de indução, vacúolos lipídicos intracelulares, que foram corados pelo *Oil Red O*. Da mesma maneira, as células mantidas no meio de diferenciação osteogênico passaram a depositar uma matriz de cálcio, que foi evidenciada pela coloração com *Alizarin Red S*. As células cultivadas em meio sem os indutores (controles) não apresentaram marcação para nenhuma das colorações (Figura 4A).

A análise dos marcadores de superfície demonstrou que mais de 95% das células não expressavam os marcadores CD45, CD11b e CD34 (Tabela 1). Esses marcadores identificam, respectivamente, leucócitos, macrófagos e células-tronco hematopóéticas e endoteliais. As culturas foram positivas para os marcadores CD44, CD90.2 e Sca-1 em níveis variáveis (Figura 4B). Dessa maneira, os resultados demonstram que o processo de isolamento empregado resultou em uma população enriquecida de células-tronco mesenquimais para utilização nos experimentos.

Tabela 1. Imunofenotipagem das CTMs. Média das frequências de células positivas para os marcadores CD11, CD34, CD44, CD45, CD90.2 e Sca-1 (n=2). O controle isotópico foi subtraído do resultado final.

CD11	CD34	CD44	CD45	CD90.2	Sca-1
0%	0,10%	78,77%	0,19%	92,19%	85,32%

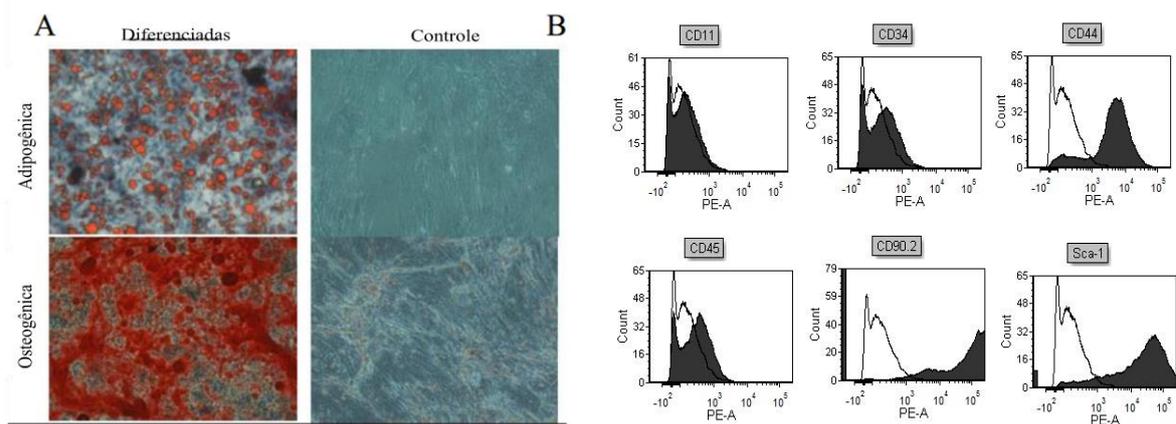


Figura 4. Caracterização das CTMs isoladas de tecido adiposo de camundongos.

(A) Imagens de culturas de células-tronco mesequimais diferenciadas por 3-4 semanas em meios de diferenciação adipogênico e osteogênico, coradas com *Oil Red O* e *Alizarin Red S*, respectivamente. Aumento de 200x. (B) Análise da expressão dos marcadores CD11b, CD34, CD44, CD45, CD90.2 e Sca-1 por citometria de fluxo (n=2).

4.2 Expressão de MHCII e viabilidade de células ativadas e não ativadas

A análise da viabilidade celular foi realizada após a ativação com IFN- γ e TNF- α para verificar a possibilidade de efeito danoso sobre as células. A frequência de células mortas, analisada por citometria de fluxo, mostrou que houve diferença significativa na quantidade de células mortas entre os tempos analisados, com um maior número de células mortas após 96h, em comparação com 24h. Não houve diferença na viabilidade das células entre o grupo não ativado e o grupo pré-ativado com IFN- γ e TNF- α , visto que o maior número de células mortas após 96h ocorreu nos dois grupos (Figura 5). Portanto, a pré-ativação das células por 20h com IFN- γ e TNF- α não parece ter efeitos negativos na viabilidade das CTMs.

Em seguida, analisou-se a expressão de moléculas MHC-II nas CTMs, para avaliar a capacidade imunogênica dessas células (Tabela 2). A análise por citometria de fluxo da expressão de moléculas de MHC-II nas células pré-ativadas e não ativadas mostrou um aumento significativo de células positivas para antígenos MHCII 24h após a incubação com IFN- γ e TNF α (Figuras 6 e 7). Esse aumento não foi encontrado 96h após a ativação, provavelmente pela retirada do estímulo. Portanto, a pré-ativação das

CTMs com IFN- γ e TNF α provocou um aumento temporário da expressão de moléculas MHC-II nessas células, revertido pela retirada do estímulo.

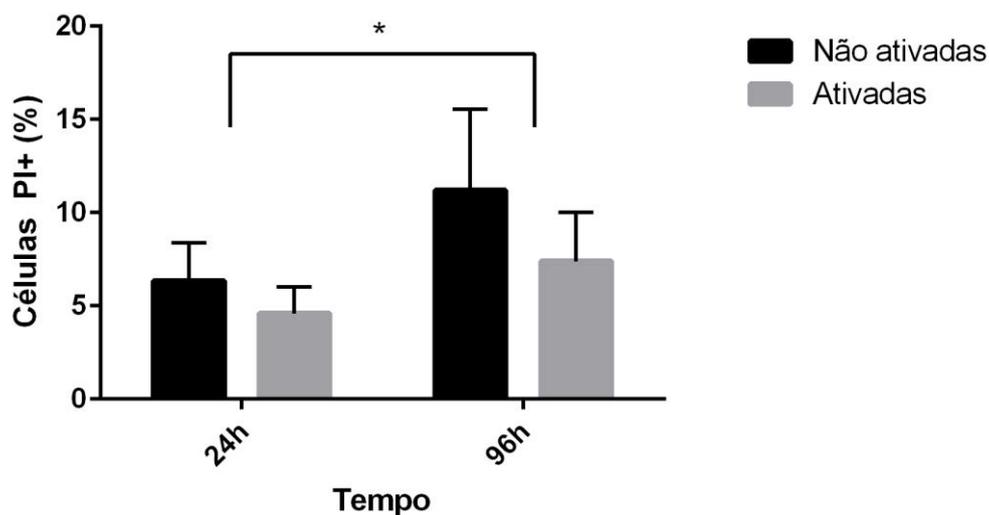


Figura 5. Teste de viabilidade celular após a pré-ativação das células-tronco mesenquimais (CTMs). Média das frequências de células mortas no grupo pré-ativado com IFN- γ e TNF- α por 20h e no grupo não ativado, após 24 e 96 horas de incubação (n=3). * P <0,05. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

Tabela 2. Frequência de CTMs positivas para MCH-II antes e após a ativação. Ativação promovida através de incubação com IFN- γ e TNF α por 20h (n=3). O controle isotópico foi subtraído do total de células positivas.

MHC-II +	CTMs antes da ativação (%)			CTMs ativadas (%)		
	24h	0,9	0,1	0,1	8,2	6,3
96h	0,1	0,1	0,1	2,5	0,3	0,9

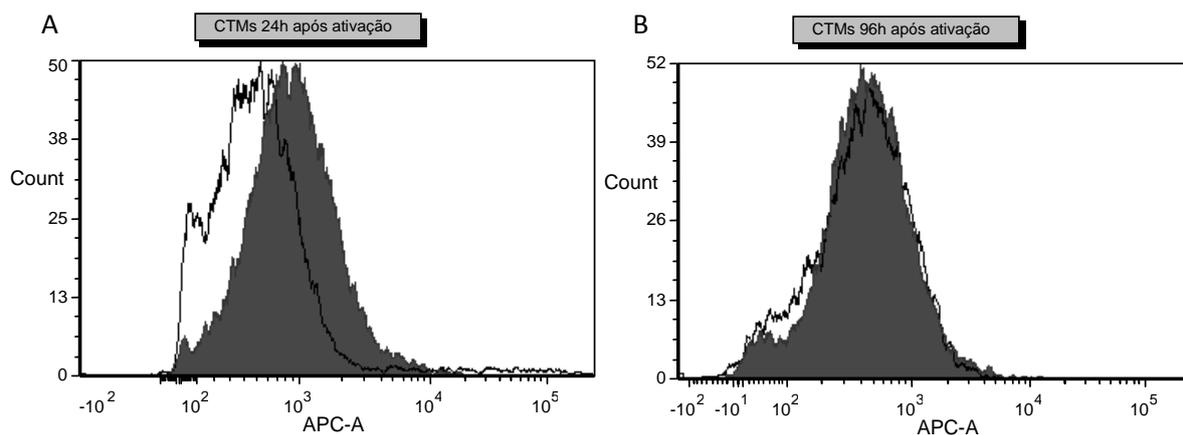


Figura 6. Análise da expressão de MHC classe II em células-tronco mesenquimais. Histogramas mostrando a expressão de MHC classe II em uma linhagem de CTM antes (linha preta) e após (preenchimento cinza) a ativação com IFN- γ e TNF- α por 20h. (A) Após 24h da ativação ocorreu um aumento da expressão de MHC classe II pelas CTMs. (B) Após 96h da ativação, não houve aumento da expressão de MHC II.

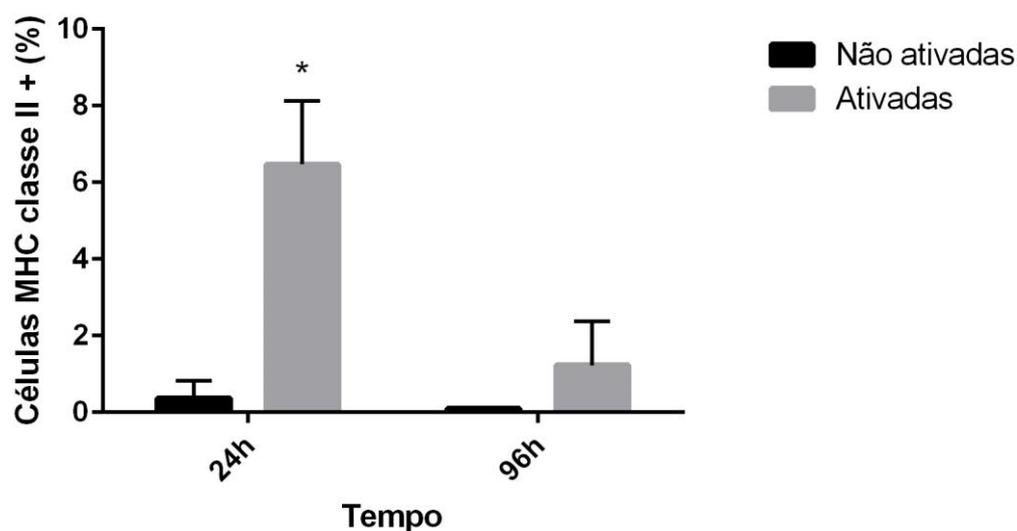


Figura 7. Expressão de MHC classe II. Média das frequências de células positivas para MHC classe II em células ativadas e não ativadas após 24 e 96 horas da ativação (n=3).

* P < 0,05. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

4.3 Análise de proliferação de esplenócitos em co-cultivo com CTMs

A análise de proliferação dos esplenócitos utilizando a incorporação com BrdU foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foi avaliado se havia diferença na proliferação celular, quando diferentes concentrações de CTMs foram utilizadas. A mudança na proporção de células para esplenócitos não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos (Figura 8). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE), calculado através da razão entre as absorvâncias das células em co-cultivo com os esplenócitos e dos esplenócitos sozinhos.

Em seguida, foi avaliado o efeito da pré-ativação das CTMs na proliferação dos esplenócitos. A análise demonstrou que as CTMs alogênicas podem ter provocado a ativação dos esplenócitos, aumentando sua proliferação. As CTMs alogênicas pré-ativadas provocaram uma menor proliferação dos esplenócitos, mas foi ainda superior à proliferação basal dos mesmos. As CTMs singênicas, por sua vez, provocaram uma redução da proliferação basal dos esplenócitos, o que foi ainda mais significativo com a pré-ativação das células (Figura 9).

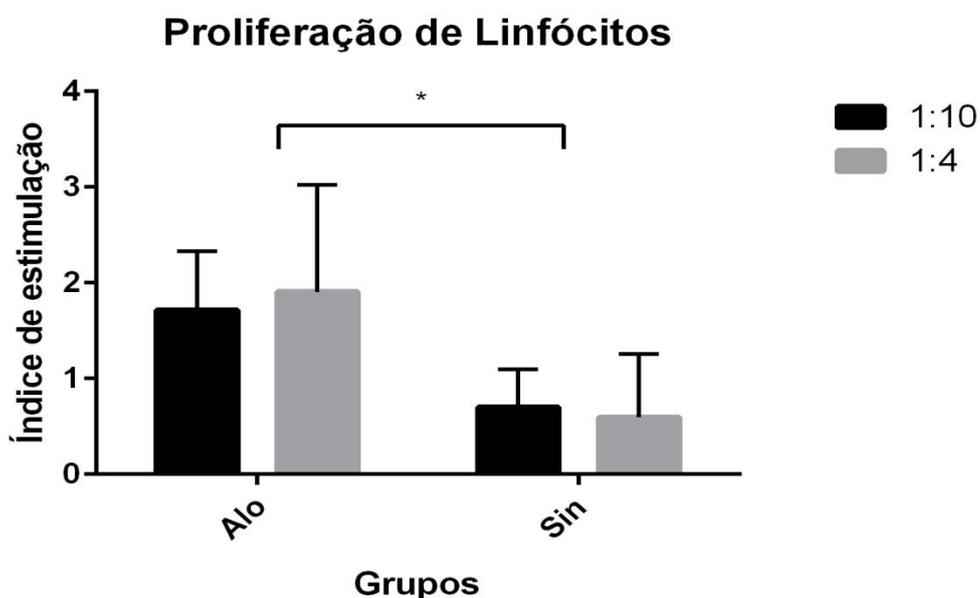


Figura 8. Análise da proliferação de esplenócitos em co-cultivo com diferentes concentrações de CTMs. Não houve diferença significativa entre as diferentes proporções de CTMs e esplenócitos (1:4 e 1:10). Houve diferença significativa entre os

grupos alogênico (n=5) e singênico (n=3). * P <0,01. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

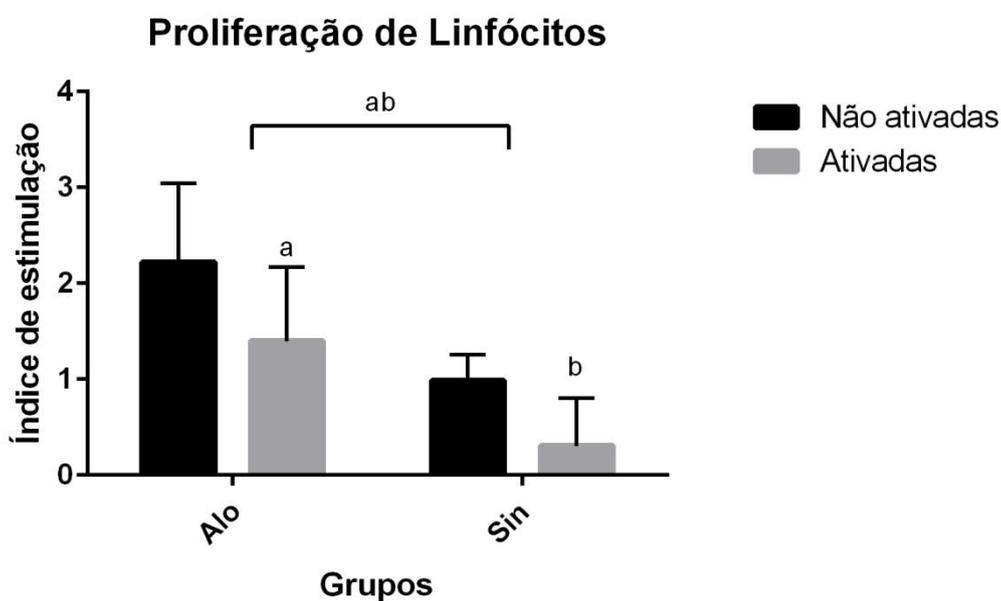


Figura 9. Análise da proliferação de esplenócitos em co-cultivo com CTMs singênicas e alogênicas pré-ativadas e não ativadas. O índice de estimulação foi calculado através da razão entre as absorvâncias das CTMs em co-cultivo com os esplenócitos e dos esplenócitos sozinhos. ab: houve diferença estatística entre os grupos alogênico (n=5) e singênico (n=3), assim como entre as células ativadas e não ativadas (a e b). P <0,01. ANOVA de duas vias, Post Hoc Tukey.

4.4 Análise da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ em co-cultivo com CTMs

A análise da ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ não mostrou diferenças significativas entre os grupos analisados (Tabela 3). Todos apresentaram frequência semelhante de linfócitos T ativados, marcados com CD69 (Figura 10).

Tabela 3. Frequência de células positivas para os marcadores CD4, CD8 e CD69. Os esplenócitos foram cultivados com células alogênicas ou singênicas (n=3), em duas proporções de células para esplenócitos (1:4 e 1:10).

	CD4 (%)	CD4/CD69 (%)	CD8 (%)	CD8/CD69 (%)
Alogênico 1:4	23,10	6,27	23,03	8,37
Alogênico ativado 1:4	23,03	6,43	39,17	5,13
Alogênico 1:10	20,83	5,50	42,73	8,17
Alogênico ativado 1:10	24,37	6,17	34,20	10,50
Singênico 1:4	18,90	7,07	20,73	5,53
Singênico ativado 1:4	34,93	4,67	51,20	4,63
Singênico 1:10	20,80	7,37	37,13	9,83
Singênico ativado 1:10	17,17	8,40	35,20	9,23

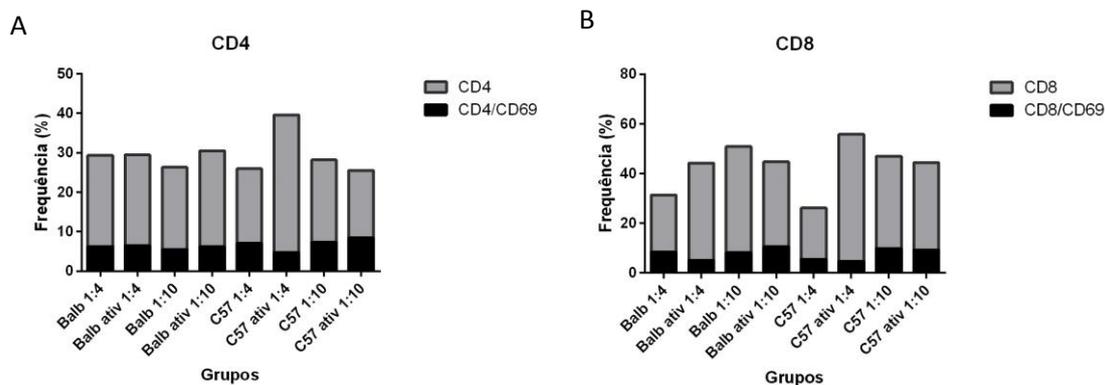


Figura 10. Análise da ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em co-cultivo com diferentes concentrações de CTMs, após 72h de incubação. Os linfócitos foram marcados para CD4 e CD69 (A) ou para CD8 e CD69 (B). Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA de duas vias foi utilizada para análise dos dados.

4.5 Transplantes

As células-tronco mesenquimais foram transplantadas em um total de 40 animais, divididos nos três grupos e os rins foram coletados nos dias 7, 14, 28 e 100 conforme a tabela 4.

Tabela 4. Distribuição do número de animais transplantados, de acordo com seus grupos. Foram transplantadas CTMs sob a cápsula renal de 40 animais, divididos em três grupos: singênico, alogênico e alogênico com CTMs pré-ativadas. Os rins transplantados foram coletados nos dias indicados.

<u>Dia</u>	<u>Singênico</u>	<u>Alogênico</u>	<u>Alogênico + MSCs ativadas</u>	<u>Nº animais</u>
7	-	5	4	9
14	-	6	6	12
28	4	5	6	15
100	4	-	-	4
Total	8	16	16	40

4.6 Análises histológicas

A análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina mostrou um grande infiltrado inflamatório em todos os rins que receberam o transplante alogênico, principalmente nos dias 7 (Figura 11 A e B) e 14 (Figura 11 C e D). Aos 28 dias, esse infiltrado esteve reduzido ou inexistente (Figura 11 E e F). Os rins que receberam células singênicas não apresentaram infiltrados de células inflamatórias em nenhum dos tempos testados (28 e 100 dias), permanecendo apenas com as CTMs transplantadas no local (Figura 11 G e H, respectivamente). Não houve diferença aparente entre os animais que receberam as células ativadas ou não ativadas.

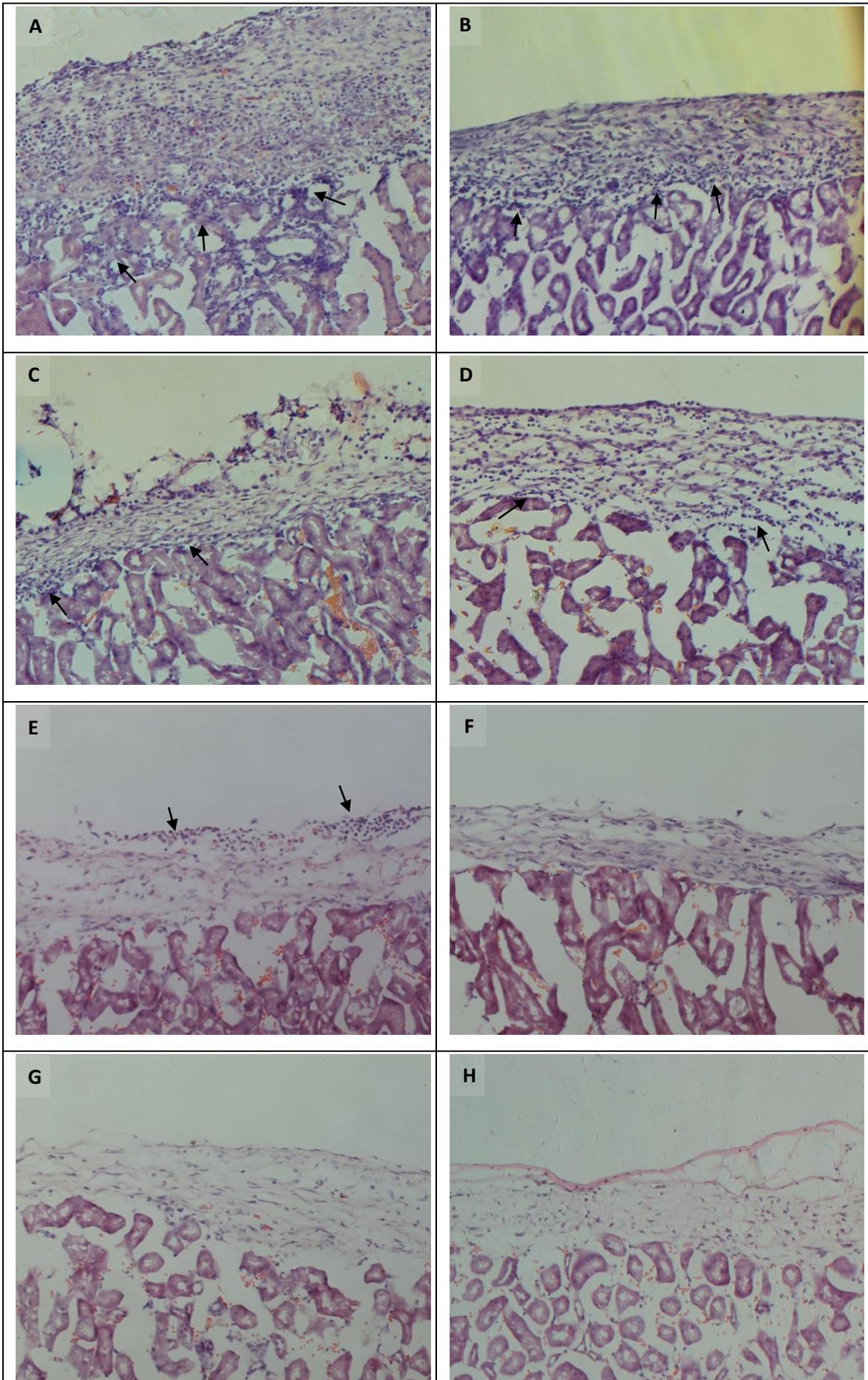
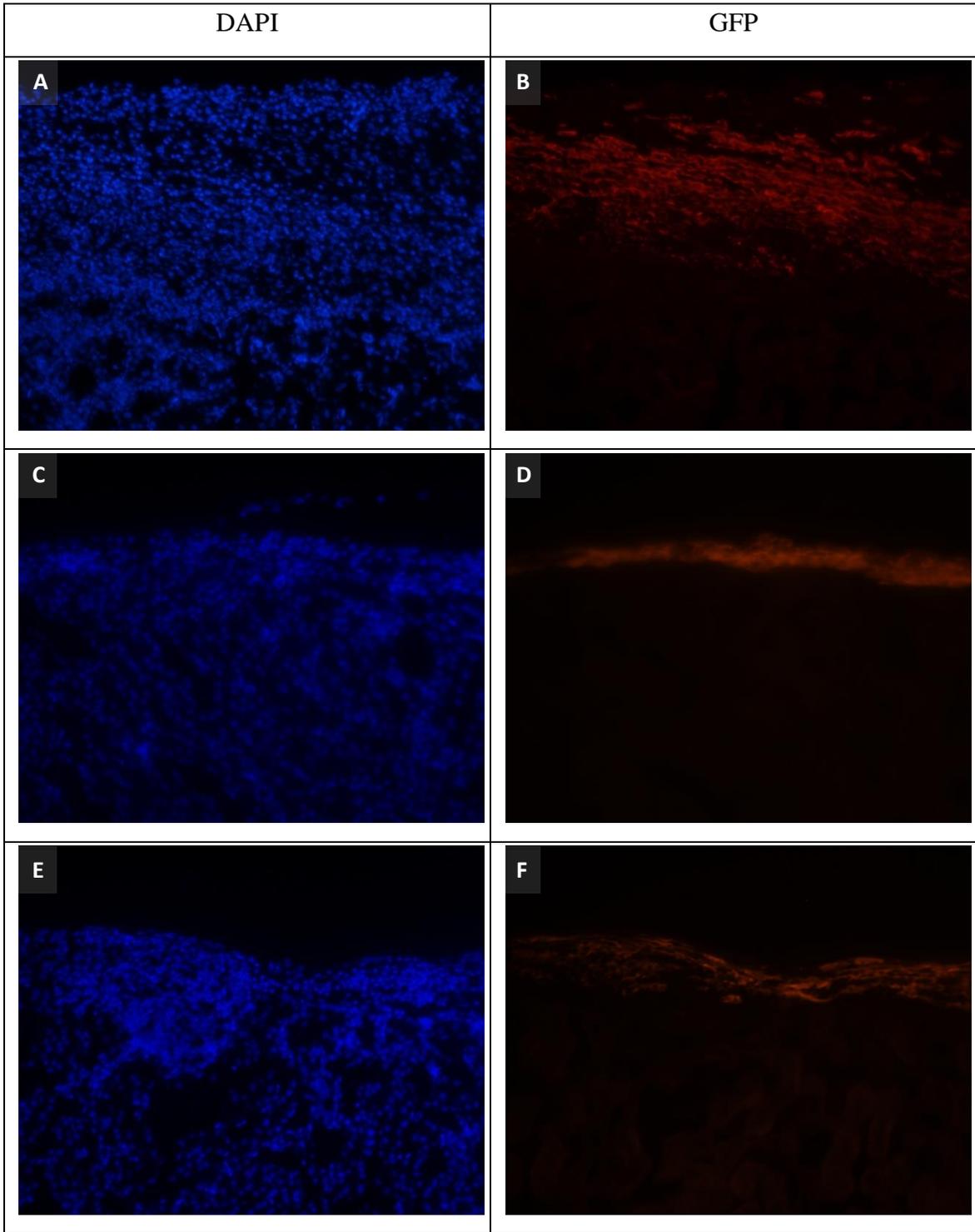


Figura 11. Análise histológica por coloração com H&E dos rins transplantados com CTMs nos diferentes grupos. (A) Alogênico 7 dias, (B) Alogênico + CTMs ativadas 7 dias, (C) Alogênico 14 dias, (D) Alogênico + CTMs ativadas 14 dias, (E) Alogênico 28 dias, (F) Alogênico + CTMs ativadas 28 dias, (G) Singênico 28 dias e (H) Singênico 100 dias. Aumento de 100x.

As células GFP⁺ foram removidas da região entre os dias 7 e 28 (Tabela 5). O mesmo não ocorreu com os rins que receberam o transplante singênico, apresentando células GFP⁺ durante todo o período de experimento (Figuras 12L). A ativação das células com IFN- γ e TNF α antes do transplante não alterou o tempo de permanência das células. Todos os animais que receberam o transplante rejeitaram as células alogênicas antes de 28 dias (Figura 13).



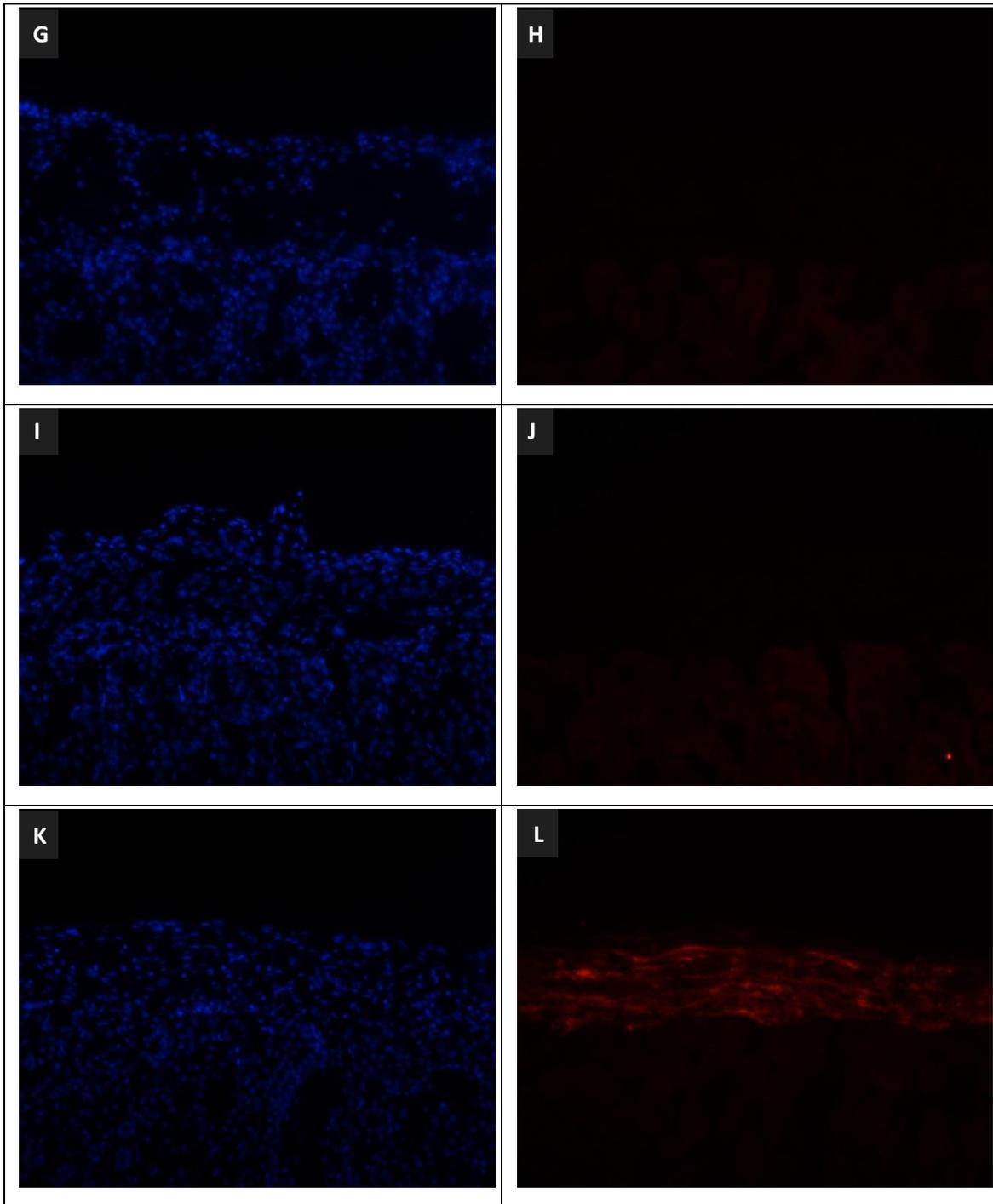


Figura 12. Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-GFP dos rins transplantados com CTMs. (A) e (B) Grupo alogênico 7 dias após o transplante marcado para DAPI e GFP+, respectivamente. (C) e (D) Alogênico 14 dias após o transplante. (E) e (F) Alogênico + CTMs ativadas 14 dias após o transplante. (G) e (H) Alogênico 28 dias após o transplante com CTMs. (I) e (J) Alogênico 28 dias após o transplante com CTMs ativadas. (K) e (L) Singênico 100 dias após o transplante. Aumento de 200x

Tabela 5. Frequência de animais que apresentaram células positivas para GFP na análise de imunofluorescência, nos diferentes grupos experimentais e dias pós-transplante.

CTMs: células-tronco mesenquimais

Grupos	CTMs	CTMs ativadas
Alogênico 7 dias	5/5 (100%)	4/4 (100%)
Alogênico 14 dias	2/6 (33,3%)	3/6 (50%)
Alogênico 28 dias	0/5 (0%)	0/6 (0%)
Singênico 28 dias	4/4 (100%)	-
Singênico 100 dias	4/4 (100%)	-

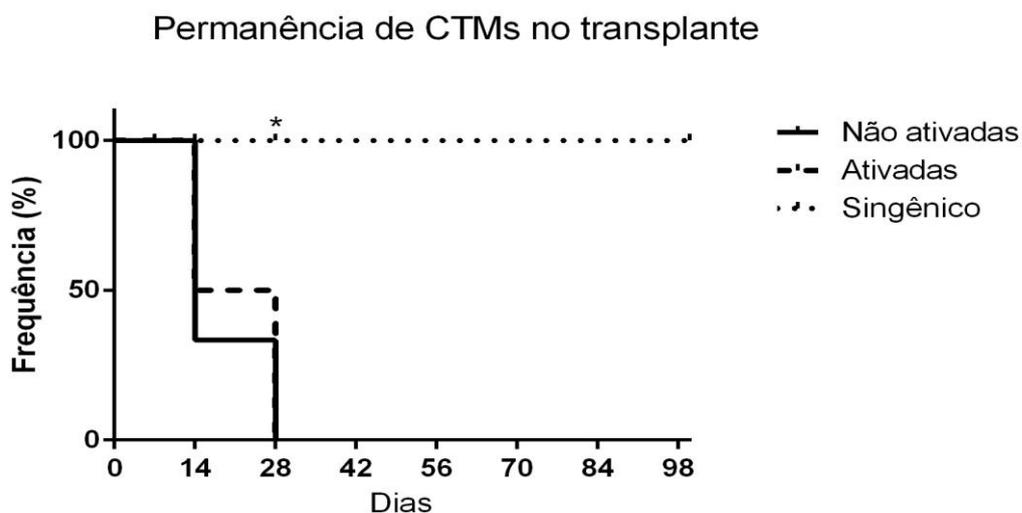


Figura 13. Sobrevida das células transplantadas nos diferentes grupos experimentais, medida através da frequência de rins contendo células positivas para GFP após análise por imunofluorescência. * $P < 0,001$. Teste de Mantel-Cox Log-Rank.

4.7 BD™ Cytometric Bead Array (CBA)

A quantificação das citocinas interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interferon- γ , fator de necrose tumoral, interleucina-17A e interleucina-10 não mostrou

diferenças significativas entre nenhum dos grupos (Figura 9). Todos os animais transplantados tiveram níveis de citocinas circulantes no plasma similares aos animais que não receberam células.

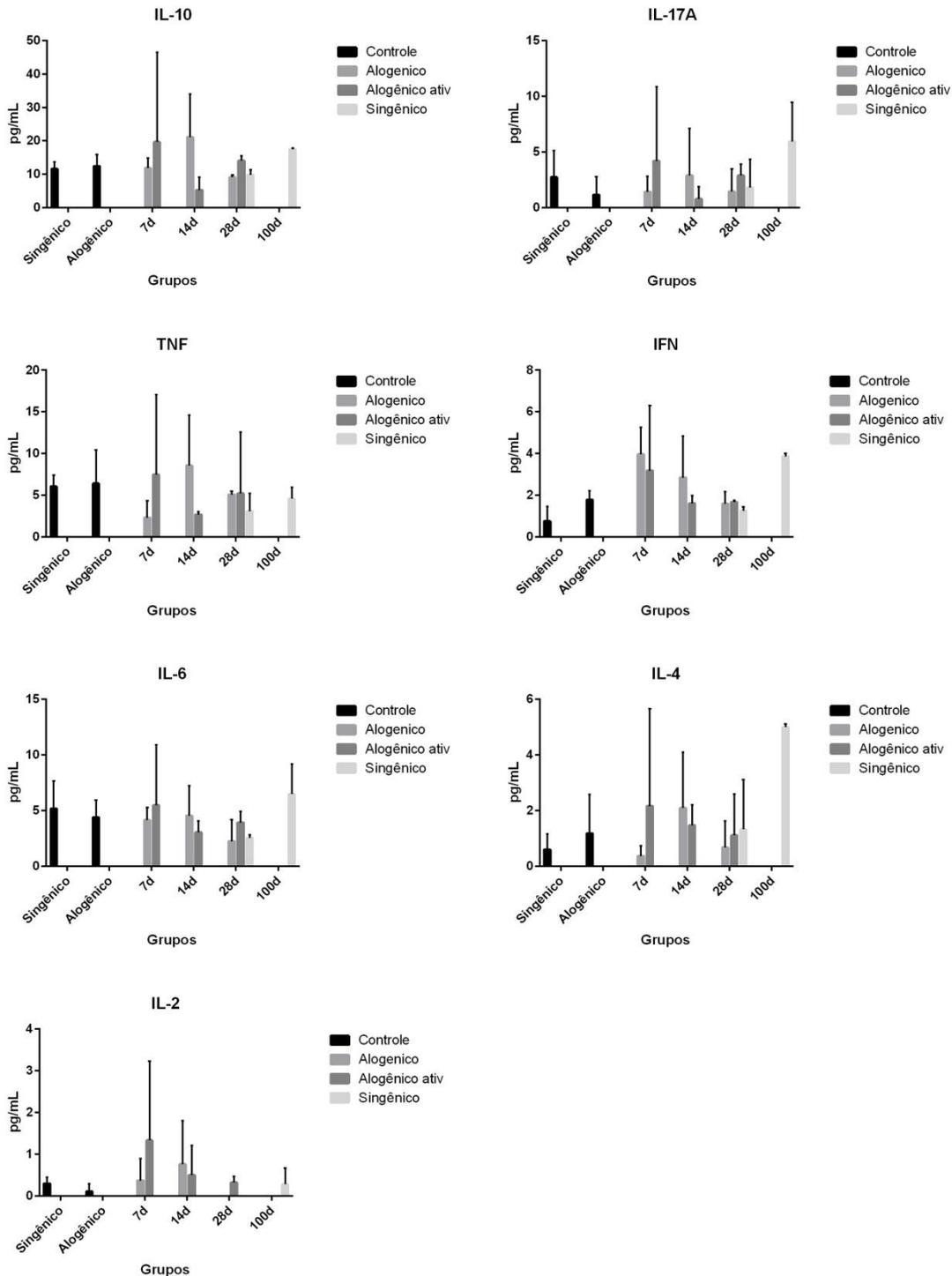


Figura 14. Quantificação das citocinas no plasma dos animais transplantados nos determinados tempos após o transplante. O plasma de animais não transplantados foi utilizado como controle. Não houve diferença significativa entre os grupos (n= 2 a 5). ANOVA de uma via.

5 DISCUSSÃO

Em contraste com diversos estudos anteriores realizados *in vitro* (BARTHOLOMEW; et al., 2002; DI NICOLA et al., 2002; MEISEL et al., 2004), os resultados do presente estudo indicam que as células-tronco mesenquimais alogênicas podem provocar a ativação de linfócitos T e gerar uma resposta imune em animais imunocompetentes, não sendo, portanto, imunoprivilegiadas conforme corroborado por outros estudos (Ankrum *et al.*, 2014).

A rejeição das células alogênicas transplantadas ocorreu entre os dias 7 e 28, sendo que, aos 14 dias a maioria dos animais ainda apresentava células no local do transplante. As células singênicas permaneceram no local do transplante por todo o período do experimento, estando visíveis até 100 dias depois nos rins dos animais.

Esses dados corroboram com os achados de Zangi e colaboradores (2009), os quais demonstraram a rejeição das CTMs alogênicas aproximadamente 20 dias após o transplante realizado por via intravenosa ou intraperitoneal em camundongos. Apesar de terem sido rejeitadas, as CTMs permaneceram no local por um tempo maior que os fibroblastos utilizados neste mesmo experimento, cujo tempo de remoção foi de aproximadamente dez dias.

A baixa expressão de MHC classe II apresentada pelas CTMs, já descrita na literatura (POTIAN et al., 2003), foi comprovada no presente experimento. Essa característica indica que as CTMs possam gerar pouca ou nenhuma reação imune em um transplante alogênico. Por outro lado, a expressão de MHC classe II foi aumentada após a pré-ativação com IFN- γ e TNF α . Esse processo poderia explicar a grande infiltração de células inflamatórias e consequente rejeição das CTMs alogênicas ocorridas *in vivo*, visto que o contexto pró-inflamatório gerado pelo transplante poderia promover a secreção local dessas moléculas, transformando as CTMs.

Embora não possa ser considerada imunoprivilegiada, a rejeição das CTMs acontece mais tardiamente do que outros tipos celulares alogênicos. O tempo e a gravidade da rejeição parecem ser dependentes do contexto e do balanço entre os fatores pró ou anti-inflamatórios secretados por estas células. As CTMs que não conseguem expressar os mecanismos imunossupressores acabam se comportando como APCs, ativando diretamente os linfócitos T e promovendo a inflamação *in vivo* (CHAN *et al.*, 2006).

Em ambientes cuja resposta imune é menos efetiva, como em tumores, por exemplo, as CTMs alogênicas e xenogênicas podem conseguir se manter no local por mais tempo do que em outros tecidos mais imunorreativos do mesmo animal. Essa característica indica que a supressão imune local pode mascarar a imunogenicidade das CTMs (DEMBINSKI *et al.*, 2013).

Embora o contexto local seja de extrema importância para o comportamento das CTMs, ele não é o único fator. As próprias células podem se comportar de maneiras diferentes, quando inseridas no mesmo contexto, o que se deve à heterogeneidade das populações de CTMs. Suas características e respostas podem variar dependendo do doador, do tecido isolado, das condições de cultivo ou até mesmo da passagem em que se encontram. Em um estudo utilizando CTMs humanas, foi demonstrado que após a infusão sistêmica em pacientes com DECH (doença do enxerto contra o hospedeiro), as células que passaram por um processo maior de expansão (passagens de 5 a 8 - P5-P8) provocaram uma reação inflamatória maior que as células em passagens iniciais (P1-P4), especialmente quando as células foram utilizadas em concentrações maiores (MOLL *et al.*, 2012).

Assim, como demonstrado em estudos anteriores, as CTMs tiveram a capacidade de reduzir a proliferação de linfócitos T *in vitro* (BARTHOLOMEW; *et al.*, 2002; DI NICOLA *et al.*, 2002). Porém, este efeito ocorreu apenas no grupo que recebeu CTMs singênicas. Quando utilizadas células alogênicas, ocorreu uma maior proliferação destes linfócitos, indicando o alorreconhecimento direto das CTMs. Essa discrepância pode ter ocorrido devido à utilização de mitógenos para provocar a proliferação dos linfócitos T nos trabalhos citados anteriormente. Essa prática pode ter alterado o microambiente inflamatório local, levando a uma mudança no padrão de secreção das CTMs. (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Outra razão para o contraste com estudos anteriores pode estar relacionado à grande heterogeneidade das populações de CTMs.

A ativação prévia das CTMs com IFN- γ e TNF α provocou uma redução significativa desta proliferação dos esplenócitos tanto no grupo alogênico quanto singênico, provavelmente pelo aumento da expressão de PGE₂ e, principalmente de NO, induzido pelos ativadores (ENGLISH *et al.*, 2007).

A alteração na proliferação de células T não foi relacionado ao aumento de células T ativadas, evidenciado pela marcação com anticorpo anti-CD69. Utilizando o mesmo protocolo para o experimento de proliferação, as células T CD4⁺ e T CD8⁺

apresentaram quantidades de células CD69+ similares nos grupos alogênico e singênico. O estudo realizado por Krampera e colaboradores (2006) mostrou resultados semelhantes, mostrando que a inibição da proliferação de células T não foi resultante da inibição da ativação nem de processos apoptóticos. Nesse experimento, as células T em co-cultivo com as CTMs demonstraram redução na proliferação, com manutenção na quantidade de células CD25+ e CD69+ (KRAMPERA et al., 2006). Esse resultado pode ser explicado pela forma de atuação de NO nas células T. Foi demonstrado que na presença de NO, as células T, mesmo quando ativadas, não conseguem prosseguir o ciclo celular e completar a mitose (BINGISSER et al., 1998). Dessa maneira, a imunomodulação das células T provocada pelas CTMs murinas não altera a expressão de CD25 e CD69 (REN et al., 2008).

A quantificação das citocinas no plasma dos animais não mostrou diferenças significativas entre nenhum dos grupos, em relação aos animais que não receberam nenhum tipo de tratamento cirúrgico. Embora tenha havido um aumento de todas as citocinas no dia 7, este não foi estatisticamente significativo, provavelmente devido ao alto desvio padrão gerado pelas amostras.

Esses resultados sugerem que as CTMs isoladas do tecido adiposo de camundongos possam provocar reações imunes *in vivo* e *in vitro*, mas isto não exclui o potencial terapêutico dessas células. Estudos sugerem que o efeito benéfico das CTMs no sistema imune não depende de sua permanência no sistema, sendo principalmente devido a um mecanismo chamado de *hit-and-run*, o qual consiste na liberação de fatores imunomodulatórios entre 24 e 48h após o transplante das CTMs. A liberação desses fatores pode ser de extrema importância para controlar doenças imunológicas, como a DECH, mesmo sem haver a permanência das CTMs no indivíduo (LEVY et al., 2013). No entanto, provavelmente o efeito terapêutico das CTMs poderia ser maior, com sua permanência mais prolongada no hospedeiro.

As estratégias para prolongar a persistência das CTMs após o transplante são divididas em duas categorias: modificação do hospedeiro e modificação das CTMs. Ge e colaboradores (2009) mostraram que a imunossupressão do hospedeiro com baixas doses de rapamicina, administradas por 14 dias após o transplante, resultou no aumento da persistência das CTMs alogênicas. Houve também tolerância ao enxerto em transplante de coração proveniente do mesmo doador das CTMs, cujas células infundidas permaneceram por 100 dias. Além disso, o hospedeiro apresentou aumento

de células dendríticas e células T tolerogênicas, não apresentando anticorpos contra as CTMs alogênicas. No entanto, as estratégias baseadas na imunossupressão do hospedeiro podem aumentar o risco de infecções em pacientes mais vulneráveis (LEVY et al., 2013).

As CTMs podem ainda ser modificadas diretamente para reduzir sua imunogenicidade. Estudos realizados por de La Garza-Rodea e colaboradores (2011) demonstraram que a utilização de proteínas provenientes de vírus, para evadir a resposta imune, pode aumentar a permanência de células alogênicas em animais imunocompetentes. As CTMs transfectadas com o gene para expressar a proteína viral US11 mostraram redução da expressão de MHC classe I e mantiveram-se nos animais imunocompetentes pelo mesmo tempo que os imunossuprimidos. Outro trabalho utilizando a mesma estratégia mostrou que as CTMs transfectadas com imunoevasinas provenientes de vírus apresentaram redução de MHC classe I e não foram reconhecidas por linfócitos T citotóxicos, assim como as células NK (SOLAND et al., 2012),

Além da expressão de proteínas virais, as CTMs podem ser condicionadas a expressar moléculas que possibilitem o aumento da capacidade de *homing* destas células, assim como a secreção de citocinas anti-inflamatórias (LEVY et al., 2013). As CTMs podem também ser preconditionadas ou carregadas com pequenas moléculas que aumentem a expressão de receptores de superfície ou a produção de fatores imunossupressores (PGE2, IDO, HLA-G, IL-10) (SARKAR et al., 2011; ANKRUM et al., 2014). Todos os dados acima indicam grandes desafios para o uso de CTMs alogênicas como uma alternativa terapêutica. Porém, o uso de CTMs autólogas também pode apresentar problemas, tendo em vista a dificuldade e o tempo necessário para gerar doses terapêuticas de CTMs após a coleta. Além disso, a grande variabilidade de padrões secretórios e potencial imunomodulatório das CTMs de diferentes doadores e tecidos isolados tem que ser levada em consideração (MELIEF et al., 2013). Dessa maneira, a padronização de terapias autólogas utilizando CTMs se torna muito difícil.

Apesar da imunogenicidade comprovada, as CTMs alogênicas ainda parecem ser seguras para a utilização em estudos clínicos. Mesmo com dados mostrando que aproximadamente 13% dos pacientes que receberam CTMs alogênicas apresentaram anticorpos contra o doador (HARE et al., 2012), doses repetidas de células são administradas frequentemente sem complicações (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

A utilização de CTMs alogênicas pode ser de grande utilidade para estudos clínicos, mas fica claro que estas células não são imunoprivilegiadas. Mesmo com as baixas expressões de MHC classes I e II apresentadas *in vitro*, essas células podem ser rejeitadas quando utilizadas em transplantes alogênicos. Isso ocorre porque o contexto pró-inflamatório envolvido no transplante promove mudanças nas CTMs, que passam a aumentar a expressão de MHC classes I e II.

A capacidade das CTMs em provocar uma imunomodulação no hospedeiro pode ter diversas aplicações terapêuticas, no tratamento de processos inflamatórios, doenças auto-imunes ou DECH. Embora o efeito *hit-and-run* exercido pelas CTMs possa ser suficiente para promover melhoras em casos clínicos (VON BAHR et al., 2012), novas estratégias de redução da imunogenicidade destas células precisam ser testadas para aumentar o tempo de permanência das células alogênicas no hospedeiro, com consequente melhora na sua função terapêutica. Essas estratégias poderão promover a maior utilização das CTMs para tratamento de diversas doenças, beneficiando um grande número de pacientes.

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que as CTMs murinas provocam resposta imunogênica quando utilizadas em transplante alogênico, com consequente aparecimento de infiltrados inflamatórios locais e total rejeição das células transplantadas antes de 28 dias após o transplante. A pré-ativação das CTMs com IFN- γ e TNF α não alterou significativamente o tempo de permanência das células após o transplante, porém aumentou a capacidade imunomodulatória das CTMs *in vitro*. Esse potencial de modular a resposta imune pode ser de grande utilidade terapêutica para o tratamento de doenças auto-imunes ou processos inflamatórios locais.

Novos estudos devem ser efetuados, na tentativa de reduzir a imunogenicidade das CTMs alogênicas, permitindo assim um maior tempo de permanência dessas células no hospedeiro e consequente aumento de sua função no tratamento de processos inflamatórios locais ou sistêmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 13, n. 4, p. 109, 2008.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n., p. 1815-1822, 2005.

ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 3, p. 252-260, 2014.

ANKRUM, J. A.; MIRANDA, O. R.; NG, K. S.; SARKAR, D.; XU, C.; KARP, J. M. Engineering cells with intracellular agent-loaded microparticles to control cell phenotype. **Nat Protoc**, v. 9, n. 2, p. 233-245, 2014.

ARIAS, R. A.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, A.; LÓPEZ-LARREA, C. IMMUNOLOGY AND THE CHALLENGE OF TRANSPLANTATION. In: Media, L. B. a. S. S. B. (Ed.). **Stem Cell Transplantation**, 2012, p.27-43.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; MCINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, n., p. 42-48, 2002.

BENICHOU, G.; MAKOTOTONSHO; GEORGESTOCCO; NADAZDIN, O.; MADSEN, J. C. Innate immunity and resistance to tolerogenesis in allotransplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 73, p., 2012.

BINGISSER, R. M.; TILBROOK, P. A.; HOLT, P. G.; KEES, U. R. Macrophage-Derived Nitric Oxide Regulates T Cell Activation via Reversible Disruption of the Jak3/STAT5 Signaling Pathway. **J Immunol**, v. 160, n., p. 5729-5734, 1998.

BLANC, K. L.; FRASSONI, F.; BALL, L.; LOCATELLI, F.; ROELOFS, H.; LEWIS, I.; LANINO, E.; SUNDBERG, B.; BERNARDO, M. E.; REMBERGER, M.; DINI, G.; EGELER, R. M.; BACIGALUPO, A.; FIBBE, W.; RINGDÉN, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**, v. 371, n., p. 1579-1586, 2008.

CAMP, D. M.; LOEFFLER, D. A.; FARRAH, D. M.; BORNEMAN, J. N.; LEWITT, P. A. Cellular immune response to intrastrially implanted allogeneic bone marrow stromal cells in a rat model of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation**, v. 6, n., p. 17, 2009.

CASIRAGHI, F.; AZZOLLINI, N.; CASSIS, P.; IMBERTI, B.; MORIGI, M.; CUGINI, D.; CAVINATO, R. A.; TODESCHINI, M.; SOLINI, S.; SONZOGNI, A.; PERICO, N.; REMUZZI, G.; NORIS, M. Pretransplant Infusion of Mesenchymal Stem Cells Prolongs the Survival of a Semiallogeneic Heart Transplant through the Generation of Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3933-3946, 2008.

CHAN, J. L.; TANG, K. C.; PATEL, A. P.; BONILLA, L. M.; PIEROBON, N.; PONZIO, N. M.; RAMESHWAR, P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-g. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4187-4824, 2006.

CHEN, L.; TREDGET, E. E.; LIU, C.; WU, Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. **PLoS One**, v. 4, n., p. 7119, 2009.

DEMBINSKI, J. L.; WILSON, S. M.; SPAETH, E. L.; STUDENY, M.; ZOMPETTA, C.; SAMUDIO, I.; ROBY, K.; ANDREEFF, M.; MARINI, F. C. Tumor stroma engraftment of gene-modified mesenchymal stem cells as anti-tumor therapy against ovarian cancer. **Cytotherapy**, v. 15, n. 1, p. 20-32, 2013.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A. M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n., p. 3838-3843, 2002.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ELIOPOULOS, N.; STAGG, J.; LEJEUNE, L.; POMMEY, S.; GALIPEAU, J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2865-2874, 2005.

ENGLISH, K.; BARRY, F. P.; FIELD-CORBETT, C. P.; MAHON, B. P. IFN-g and TNF-a differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, v. 110, n., p. 91-100, 2007.

FIGLIUZZI, M.; BONANDRINI, B.; SILVANI, S.; REMUZZI, A. Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. **World J Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 163-172, 2014.

FRANÇOIS, M.; ROMIEU-MOUREZ, R.; LI, M.; GALIPEAU, J. Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 1, p. 187-195, 2012.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; K.S.LALYKINA. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n., p. 393-403, 1970.

GE, W.; JIANG, J.; BAROJA, M. L.; J. ARP; ZASSOKO, R.; LIU, W.; BARTHOLOMEW, A.; GARCIA, B.; WANG, H. Infusion of Mesenchymal Stem Cells and Rapamycin Synergize to Attenuate Alloimmune Responses and Promote Cardiac Allograft Tolerance. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n., p. 1760–1772, 2009.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

HARE, J. M.; FISHMAN, J. E.; GERSTENBLITH, G.; DIFEDE VELAZQUEZ, D. L.; ZAMBRANO, J. P.; SUNCION, V. Y.; TRACY, M.; GHERSIN, E.; JOHNSTON, P. V.; BRINKER, J. A.; BRETON, E.; DAVIS-SPROUL, J.; SCHULMAN, I. H.; BYRNES, J.; MENDIZABAL, A. M.; LOWERY, M. H.; ROUY, D.; ALTMAN, P.; WONG PO FOO, C.; RUIZ, P.; AMADOR, A.; DA SILVA, J.; MCNIECE, I. K.; HELDMAN, A. W.; GEORGE, R.; LARDO, A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. **JAMA**, v. 308, n. 22, p. 2369-2379, 2012.

KRAMPERA, M.; GLENNIE, S.; DYSON, J.; SCOTT, D.; LAYLOR, R.; SIMPSON, E.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n., p. 3722–3729, 2003.

KRAMPERA, M.; COSMI, L.; ANGELI, R.; PASINI, A.; LIOTTA, F.; ANDREINI, A.; SANTARLASCI, V.; MAZZINGHI, B.; PIZZOLO, G.; VINANTE, F.; ROMAGNANI, P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 386-398, 2006.

KUNTER, U.; RONG, S.; DJURIC, Z.; BOOR, P.; MU, G.; YU, D.; FLOEGE, J. Transplanted Mesenchymal Stem Cells Accelerate Glomerular Healing in Experimental Glomerulonephritis **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 2202-2212, p., 2006.

LAROSA, D. F.; RAHMAN, A. H.; TURKA, L. A. The Innate Immune System in Allograft Rejection and Tolerance. **J Immunol**, v. 178, n., p. 7503-7509, 2007.

LEE, R. H.; SEO, M. J.; REGER, R. L.; SPEES, J. L.; PULIN, A. A.; OLSON, S. D.; PROCKOP, D. J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **PNAS**, v. 103, n. 46, p. 17438–17443, 2006.

LEVY, O.; ZHAO, W.; MORTENSEN, L. J.; LEBLANC, S.; TSANG, K.; FU, M.; PHILLIPS, J. A.; SAGAR, V.; ANANDAKUMARAN, P.; NGAI, J.; CUI, C. H.; EIMON, P.; ANGEL, M.; LIN, C. P.; YANIK, M. F.; KARP, J. M. mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation. **Blood**, v. 122, n. 14, p. 24-32, 2013.

MAIER, S.; TERTILT, C.; CHAMBRON, N.; GERAUER, K.; HÜSER, N.; HEIDECHE, C.-D.; PFEFFER, K. Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. **NATURE MEDICINE**, v. 7, n. 5, p. 557-562, 2001.

MARIGO, I.; DAZZI, F. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. **Semin Immunopathol**, v. 33, n. 6, p. 593-602, 2011.

MEIRELLES, L. D. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n., p. 2204-2213, 2006.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GOBEL, U.; DAUBENER, W.; DILLOO, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619-4621, 2004.

MELIEF, S. M.; ZWAGINGA, J. J.; FIBBE, W. E.; ROELOFS, H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 6, p. 455-463, 2013.

MOLL, G.; RASMUSSEN-DUPREZ, I.; VON BAHR, L.; CONNOLLY-ANDERSEN, A. M.; ELGUE, G.; FUNKE, L.; HAMAD, O. A.; LONNIES, H.; MAGNUSSON, P. U.; SANCHEZ, J.; TERAMURA, Y.; NILSSON-EKDAHL, K.; RINGDEN, O.; KORSGREN, O.; NILSSON, B.; LE BLANC, K. Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? **Stem Cells**, v. 30, n. 7, p. 1565-1574, 2012.

NAGAYA, N.; FUJII, T.; IWASE, T.; OHGUSHI, H.; ITOH, T.; UEMATSU, M.; YAMAGISHI, M.; MORI, H.; KANGAWA, K.; KITAMURA, S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 6, p. H2670-2676, 2004.

NAUTA, A. J.; KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34+-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2080-2087, 2006.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n., p. 3499-3506, 2007.

ORTIZ, L. A.; GAMBELLI, F.; MCBRIDE, C.; GAUPP, D.; BADDOO, M.; KAMINSKI, N.; PHINNEY, D. G. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8407-8411, 2003.

ORTIZ, L. A.; DUTREIL, M.; FATTMAN, C.; PANDEY, A. C.; TORRES, G.; GO, K.; PHINNEY, D. G. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **PNAS**, v. 104, n. 26, p. 11002-11007, 2007.

POTIAN, J. A.; AVIV, H.; PONZIO, N. M.; HARRISON, J. S.; RAMESHWAR, P. Veto-Like Activity of Mesenchymal Stem Cells: Functional Discrimination Between Cellular Responses to Alloantigens and Recall Antigens. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3426-3434, 2003.

RASMUSSEN, I.; LE BLANC, K.; SUNDBERG, B.; RINGDEN, O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. **Scand J Immunol**, v. 65, n. 4, p. 336-343, 2007.

REN, G.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; XU, G.; ZHANG, Y.; ROBERTS, A. I.; ZHAO, R. C.; SHI, Y. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. **Cell Stem Cell**, v. 2, n., p. 141-150, 2008.

REN, G.; SU, J.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; LING, W.; L'HUILLIE, A.; ZHANG, J.; LU, Y.; ROBERTS, A. I.; JI, W.; ZHANG, H.; RABSON, A. B.; SHI, Y. Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. **STEM CELLS** 2009, v. 27, n., p. 1954-1962, 2009.

ROY, S.; BARNES, P. F.; GARG, A.; WU, S.; COSMAN, D.; VANKAYALAPATI, R. NK Cells Lyse T Regulatory Cells That Expand in Response to an Intracellular Pathogen. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1729-1736, 2008.

SARKAR, D.; ANKRUM, J. A.; TEO, G. S. L.; CARMAN, C. V.; KARP, J. M. Cellular and Extracellular Programming of Cell Fate through Engineered Intracrine-, Paracrine-, and Endocrine-like Mechanisms. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 3053-3061, 2011.

SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I.; MEGURO, A.; HATANAKA, K.; NAGAI, T.; MUROI, K.; OZAWA, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 228-234, 2007.

SCHULERI, K. H.; FEIGENBAUM, G. S.; CENTOLA, M.; WEISS, E. S.; ZIMMET, J. M.; TURNEY, J.; KELLNER, J.; ZVIMAN, M. M.; HATZISTERGOS, K. E.; DETRICK, B.; CONTE, J. V.; MCNIECE, I.; STEENBERGEN, C.; LARDO, A. C.; HARE, J. M. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. **Eur Heart J**, v. 30, n. 22, p. 2722-2732, 2009.

SECCO, M.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; FOGACA, L. L. Q.; CERQUEIRA, A.; CARVALHO, M. D. F.; JAZEDJE, T.; OKAMOTO, O. K.; MUOTRI, A. R.; ZATZ, M. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! **Stem Cells**, v. 26, n., p. 146-150, 2008.

SHENG, H.; WANG, Y.; JIN, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; WANG, L.; SHEN, B.; YIN, S.; LIU, W.; CUI, L.; LI, N. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. **Cell Res**, v. 18, n. 8, p. 846-857, 2008.

SOLAND, M. A.; BEGO, M. G.; COLLETTI, E.; PORADA, C. D.; ZANJANI, E. D.; JEOR, S. S.; ALMEIDA-PORADA, G. Modulation of Human Mesenchymal Stem Cell Immunogenicity through Forced Expression of Human Cytomegalovirus US Proteins. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36163, 2012.

SPAGGIARI, G. M.; CAPOBIANCO, A.; BECCHETTI, S.; MINGARI, M. C.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1484-1490, 2006.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n., p. 663-676, 2006.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 10, p. 2566-2573, 2006.

UEHARA, S.; CHASE, C. M.; KITCHENS, W. H.; ROSE, H. S.; COLVIN, R. B.; RUSSELL, P. S.; MADSEN, J. C. NK Cells Can Trigger Allograft Vasculopathy: The Role of Hybrid Resistance in Solid Organ Allografts. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3424-3430, 2005.

VON BAHR, L.; BATSIS, I.; MOLL, G.; HAGG, M.; SZAKOS, A.; SUNDBERG, B.; UZUNEL, M.; RINGDEN, O.; LE BLANC, K. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. **Stem Cells**, v. 30, n. 7, p. 1575-1578, 2012.

WATERMAN, R. S.; TOMCHUCK, S. L.; HENKLE, S. L.; BETANCOURT, A. M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10088, 2010.

YOSHIDA, O.; AKBAR, F.; MIYAKE, T.; ABE, M.; MATSUURA, B.; HIASA, Y.; ONJI, M. Impaired dendritic cell functions because of depletion of natural killer cells disrupt antigen-specific immune responses in mice: restoration of adaptive immunity in natural killer-depleted mice by antigen-pulsed dendritic cell. **Clin Exp Immunol**, v. 152, n. 1, p. 174-181, 2008.

ZANGI, L.; MARGALIT, R.; REICH-ZELIGER, S.; BACHAR-LUSTIG, E.; BEILHACK, A.; NEGRIN, R.; REISNER, Y. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2865-2874, 2009.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **TISSUE ENGINEERING**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

"The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012". **Nobelprize.org. Nobel Media AB** 2014. Web. 18 fev 2015.

<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/>