

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
COMISSÃO DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
PROVENIENTES DO RIM, PÂNCREAS, PULMÃO, BAÇO, AORTA E GORDURA  
DE CAMUNDONGOS**

**Autor: Régis Linhares Oliveira  
Nº do cartão: 00165849**

**PORTO ALEGRE,  
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
COMISSÃO DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
PROVENIENTES DO RIM, PÂNCREAS, PULMÃO, BAÇO, AORTA E GORDURA  
DE CAMUNDONGOS**

Autor: Régis Linhares Oliveira  
Nº do cartão: 00165849

Monografia apresentada à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
graduação em Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke  
Co-orientador: Dr. Pedro Cesar Chagastelles

**PORTO ALEGRE,  
2012**

## RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido o alvo de diversos estudos científicos devido a sua facilidade de obtenção e alto potencial terapêutico, entretanto suas características biológicas ainda não são completamente conhecidas. Recentemente, foi descoberto um papel importante dessas células na regulação e modulação da resposta imune, com capacidade de interação com diversas outras células do sistema imune. O mecanismo pelo qual as CTMs desempenham esse papel está relacionado com um conjunto de fatores que elas secretam, também conhecido como efeito parácrino. O objetivo do presente trabalho foi isolar células-tronco mesenquimais do rim, pâncreas, pulmão, baço, aorta e gordura de camundongos e caracterizá-las quanto aos marcadores de superfície e potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico. As células isoladas apresentaram morfologia típica de CTMs logo após o isolamento, a qual foi mantida durante as passagens subsequentes. Os marcadores analisados por citometria de fluxo mostraram que as culturas não expressaram marcadores típicos de macrófagos (CD11b), células endoteliais (CD31) e células do sistema imune (CD45), mas expressaram os marcadores mesenquimais CD44, CD90.2 e Sca-1 de maneira variada. Além disso, os resultados preliminares mostraram que as CTMs expressaram receptores de superfície relacionados com o reconhecimento de patógenos (Tlr3 e Tlr4) em duas culturas analisadas. Adicionalmente, realizou-se a padronização das reações de PCR quantitativo para os genes BACT, GAPDH, INOS, MMP-2, IL-6 e CD274, os quais serão utilizados em experimentos subsequentes. Assim, foi possível isolar células-tronco mesenquimais de diferentes tecidos e órgãos de camundongos, bem como realizar as análises dos marcadores de superfície e a padronização do PCR quantitativo, os quais irão ajudar a entender os mecanismos de ação dessas células na modulação da resposta imune.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais, camundongos, regeneração tecidual, resposta imune.

## ***ABSTRACT***

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been the focus of several scientific studies due to their relatively easy availability and high therapeutic potential; however the biological characteristics presented by them are not fully understood. An important role of these cells in the regulation and modulation of the immune response was recently discovered. MSCs are able to interact with different cells of the immune system. The mechanisms by which MSCs play this role are related to a panel of factors secreted by them in a mechanism that is also known as the paracrine effect. The aim of this study was to isolate MSCs from the kidney, pancreas, lung, spleen, aorta and adipose tissue of mice and also to evaluate the expression of their surface markers to help understand the mechanisms used by these cells in tissue regeneration and modulation of the immune response. Isolated cells presented a typical MSC-like morphology after the cell isolation, which remained during the subsequent passages. The cell surface markers analyzed by flow cytometry showed that the cells did not express markers for macrophages (CD11b), endothelial cells (CD31) and leukocytes (CD45), but expressed at some degree mesenchymal markers CD44, CD90.2 and Sca-1. Furthermore, preliminary results showed expression of receptors involved in the recognition of pathogens (Tlr3 e Tlr4) in the two cultures analyzed. Additionally the standardization of quantitative PCR reaction for BACT, GAPDH, INOS, MMP-2, IL-6 and CD274 genes was performed. It was possible to isolate mesenchymal stem cells from different tissues and organs from mice. The measurement of the expression for these genes will be analyzed in further experiments. Additional analysis of these cells as well as the qPCR standardized in this study might help to understand the mechanism of action by which MSCs modulate the immune response.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, mice, tissue regeneration, immune response.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. **Fotografia de camundongo da linhagem C57Bl/6 utilizado nos experimentos.**

Figura 2. **Disposição dos meios utilizados na placa de 12 poços para diferenciação das culturas de células-tronco mesenquimais.** Todos os poços continham células provenientes do mesmo órgão na quarta ou quinta passagens. Nos poços A e C as células foram mantidas com os meios de diferenciação adipogênico e osteogênico, respectivamente. Nos poços B e D as células foram mantidas em meio suplementado e utilizadas como controle negativo das respectivas diferenciações.

Figura 3. **Imagens de microscopia mostrando a morfologia das células-tronco mesenquimais isoladas de aorta, tecido adiposo, pâncreas, pulmão, baço e rim.** Aumento de 200x.

Figura 4. **Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais isoladas de rim, tecido adiposo, pâncreas, baço, pulmão e aorta analisadas com os anticorpo anti-CD11b, -CD31, -CD44, -CD45, -CD90.2 e -Sca-1.**

Figura 5. **Imagens de culturas de células-tronco mesenquimais isoladas de diferentes órgãos de camundongos diferenciadas por 3-4 semanas em um fenótipo adipogênico e culturas controle, coradas com *Oil Red O*.** Aumento de 200x.

Figura 6. **Imagens de culturas de células-tronco mesenquimais isoladas de diferentes órgãos de camundongos diferenciadas por 3-4 semanas em um fenótipo osteogênico e culturas controle, coradas com *Alizarin Red S*.** Aumento de 200x.

Figura 7. **Purificação de macrófagos a partir de culturas de medula óssea de camundongo por *cell sorting* e padronização das reações de qPCR.** A figura (A) demonstra o gráfico das células antes da separação e a (B) após a separação em citômetro de fluxo. As Figuras (C) e (D) apresentam a morfologia de macrófagos antes e após a ativação com 100 U/ml de IFN- $\gamma$  e 10 ng/ml de LPS, respectivamente. A padronização das reações de PCR quantitativo utilizando os *primers* específicos para (E) Actb, (F) Gapdh, (G) Inos, (H)

Mmp2, (I) Il-6 e (J) CD274. Os gráficos (E-J) mostram a amplificação dos transcritos obtidas através da diluição do cDNA de macrófagos ativados.

**Figura 8. Resultados preliminares da expressão de Actb, Tlr3 e Tlr4 em células-tronco mesenquimais isoladas de pâncreas e pulmão.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTE - célula-tronco embrionária.

CTM - célula-tronco mesenquimal.

DECH – doença do enxerto contra o hospedeiro.

CTA - célula-tronco adulta.

CTH - célula-tronco hematopoética.

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's Medium*.

TLR – *Toll-like receptor*, receptor Toll-like.

qPCR – PCR quantitativo.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
<b>2.1</b>	<b>Células-tronco mesenquimais</b> .....	11
<b>2.2</b>	<b>Moléculas envolvidas na resposta imune</b> .....	12
<b>3</b>	<b>ESTUDO EXPERIMENTAL</b> .....	14
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	14
<b>3.2</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	14
3.2.1	Animais .....	14
3.2.2	Meios e reagentes .....	15
3.2.3	Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais e macrófagos murinos .....	15
3.2.4	Diferenciação celular .....	16
3.2.5	Citometria de fluxo .....	17
3.2.6	Padronização das reações de PCR quantitativo (qPCR).....	17
<b>3.3</b>	<b>Resultados</b> .....	19
<b>3.4</b>	<b>Discussão</b> .....	29
<b>3.5</b>	<b>Conclusão do estudo experimental</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33



## 1 INTRODUÇÃO

As últimas décadas foram marcadas por um crescimento expressivo nos estudos que utilizam células-tronco. A descoberta de células com capacidade de expansão e diferenciação em células especializadas possibilita a sua aplicação no tratamento de inúmeras doenças humanas e animais. Entre as células mais visadas para aplicação terapêutica, estão as células-tronco embrionárias (CTEs) e as células-tronco mesenquimais (CTMs).

As CTMs possuem vantagens em relação às CTEs no que se refere à facilidade de obtenção. As CTMs células são facilmente isoladas de locais com a medula óssea, polpa dentária, tecido adiposo e cordão umbilical, porém sabe-se que essas células podem ser isoladas de qualquer tecido vascularizado.

Embora as CTMs células já sejam aplicadas em estudos clínicos, muitas questões relacionadas a sua biologia ainda não foram totalmente elucidadas. Entre as características apresentadas por essas células pode-se destacar a capacidade de diferenciação em células da linhagem mesenquimal, como adipócitos, osteoblastos e condroblastos. Além disso, as CTMs são capazes de responder a estímulos do ambiente, auxiliando no processo de regeneração tecidual. Uma das últimas características descobertas das CTMs é a capacidade de modulação da resposta imune frente a diferentes contextos. Dependendo dos sinais recebidos, as CTMs podem atuar em processos pró-inflamatórios, auxiliando na eliminação de patógenos, ou anti-inflamatórios, impedindo o aparecimento de uma resposta imune exacerbada.

Dessa maneira, as CTMs têm uma aplicação importante em doenças nas quais ocorre um desbalanço da resposta imune. Exemplos de doenças tratadas com CTMs são: Diabetes melittus tipo 1, Artrite Reumatóide e Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH). Apesar disso, um maior entendimento dos sinais e das moléculas envolvidas na resposta de CTMs são importantes para o estabelecimento de protocolos pré-clínicos e clínicos com essas células.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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 pelo menos um tipo celular especializado (BRETZEL e colaboradores, 2004). As CT são classificadas de acordo com a sua origem como células-tronco embrionárias (CTEs) e células-tronco adultas (CTAs). As CTEs são isoladas da porção interna do blastocisto e apresentam como característica a pluripotência, podendo se diferenciar em todas as células especializadas do organismo. No tecido adulto, as CTs são responsáveis pela reposição das células perdidas naturalmente ou em decorrência de danos ao tecido (CHAGASTELLES e colaboradores, 2010). As CTAs são aquelas que podem ser isoladas de qualquer tecido formado e, embora possuam limitações na capacidade de diferenciação, essas células têm sido muito utilizadas em pesquisas devido às implicações éticas que limitam o uso das CTEs humanas.

A primeira célula-tronco reportada no tecido humano foi a célula-tronco hematopoética (CTH). A CTH é uma célula multipotente que, na hematopoese extra-uterina, localiza-se principalmente na medula óssea e dá origem às diferentes células do sangue, tanto da linhagem mielóide (eritrócitos, megacariócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos), quanto da linhagem linfóide (linfócitos B e T e células *natural killer*) (WEISSMAN, 2000).

Além das CTHs, outras células-tronco já foram descritas como responsáveis na manutenção e renovação do tecido adulto, como as células-tronco epiteliais, neurais e mesenquimais. A primeira é encontrada na epiderme, dando origem a todas as células das camadas epiteliais (SLACK, 2000). A célula-tronco neural situa-se no cérebro e pode originar neurônios, astrócitos, oligodentrócitos e células sanguíneas (MCKAY, 1997; BJORNSON e colegas, 1999; GAGE, 2000). A célula-tronco mesenquimal (CTM) está presente em diversos órgãos e regiões perivasculares de todos os tecidos e é capaz de se diferenciar *in vitro* em células derivadas da linhagem mesenquimal, tais como adipócitos, osteoblastos e condrócitos (MEIRELLES e colaboradores, 2006).

## 2.1 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 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. Esse procedimento eliminava grande parte das CTHs e sua progênie. As células restantes eram mantidas em cultura, apresentando-se fusiformes, semelhantes a fibroblastos, e com capacidade de se multiplicar rapidamente *in vitro* após alguns dias em cultura (MEIRELLES e colaboradores, 2008). Estudos mais recentes demonstraram a ocorrência disseminada de CTMs no organismo, na região perivascular, indicando que possivelmente tenham um papel importante na manutenção deste compartimento nos diferentes órgãos e tecidos (MEIRELLES e colaboradores, 2006). Inicialmente, acreditava-se que as CTMs poderiam ser caracterizadas como pluripotentes, sendo capazes de se diferenciar em células das três camadas germinativas: mesoderma (PITTENGER e colaboradores, 1999), ectoderma (KOPEN e colaboradores, 1999) e endoderma (SATO e colaboradores, 2005). Estudos mais recentes (SCUTERI e colaboradores, 2011; DAVANI e colaboradores, 2007) demonstraram que a diferenciação das CTMs em células de origem endodérmica e ectodérmica é bastante ineficiente e as células não possuem a funcionalidade esperada para os tipos celulares maduros desses tecidos.

Embora nenhum marcador único das CTMs seja conhecido, a imunofenotipagem tem sido muito utilizada na caracterização dessas células. A análise dos marcadores de superfície de células murinas demonstra que todas as células-tronco mesenquimais devem expressar CD29 e CD44, sendo negativas para os marcadores hematopoiéticos, CD11b, CD45, e endoteliais, CD31. Algumas variações no imunofenótipo das células podem ocorrer, dependendo do órgão de origem, como a expressão das moléculas Sca-1 e CD49e, que pode ser variável entre as populações celulares. A expressão do marcador CD90.2, embora presente em todas as linhagens, pode variar na porcentagem de células positivas (MEIRELLES e colaboradores, 2006).

Pode-se considerar uma população de células em cultura como CTMs se a mesma possuir capacidade de auto-renovação *in vitro*, bem como, em condições de cultivo adequadas, diferenciação em diferentes tipos celulares de origem mesenquimal, tais como, adipócitos, condroblastos e osteócitos (MEIRELLES e colaboradores, 2008).

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. O papel nos processos de reparo e regeneração, em muitos casos, não parece ser atribuído a diferenciação em células do tecido, mas sim ao efeito parácrino exercido por essas células. As CTMs são capazes de secretar moléculas antiapoptóticas, neoangiogênicas, pró-mitóticas e com função sobre as células do sistema imune, apresentando um importante papel imunossupressor (MEIRELLES e colaboradores, 2008).

As CTMs humanas inibem a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, por um mecanismo dose-dependente e não apoptótico, mediado por fatores solúveis (DI NICOLA e colaboradores, 2002). Estudos demonstram que as CTMs desempenham seu papel alterando o padrão de secreção de diversas citocinas em células envolvidas no processo inflamatório e atuando sobre diversas outras células do sistema imune. De maneira geral, as CTMs parecem alterar o padrão de resposta de linfócitos de Th1 para Th2 (AGGARWAL e PITTENGER, 2005). Entretanto, resultados controversos também mostram que as CTMs podem apresentar um comportamento pró-inflamatório em alguns casos (LEI e colaboradores, 2011; CARRION e colaboradores, 2010; RENNER e colaboradores, 2009). Essas diferenças poderiam ser explicadas devido a uma ação dicotômica dessas células em resposta a sinais ou contextos inflamatórios percebidos por elas (BUNNELL e colaboradores, 2010).

Um estudo recente apontou que as CTMs são capazes de responder de maneiras diferentes de acordo com o estímulo recebido (BUNNELL e colaboradores, 2010; WATERMAN e colaboradores, 2010). Segundo a classificação dos autores, CTMs do tipo 1 (CTMs1), quando estimuladas com LPS (ligante do Receptor Toll-like 4), respondem produzindo moléculas pró-inflamatórias, o que indicaria um comportamento de início de inflamação. Por outro lado, CTMs do tipo 2 (CTMs2), quando estimuladas com Poli(I:C) (ligante do Receptor Toll-like 3), respondem produzindo moléculas anti-inflamatórias. Essa plasticidade na resposta das CTMs sugerem que elas possuam um papel importante na montagem e regulação da resposta imune *in vivo*.

## **2.2 Moléculas envolvidas na resposta imune**

Algumas das moléculas envolvidas na modulação da resposta imune mediada por CTMs já são conhecidas. Sabe-se também que existem diferenças entre espécies no que se

refere às moléculas envolvidas nesse processo. Sabe-se que as CTMs expressam em sua superfície receptores Toll-like, responsáveis pelo reconhecimento de inúmeras estruturas conservadas presentes em diferentes patógenos, como vírus e bactérias (PEVSNER-FISCHER e colaboradores, 2007). Demonstrou-se que CTMs humanas expressam altos níveis de Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) comparado com CTMs murinas. Em contrapartida, o mecanismo pelo qual CTMs de camundongo desempenham seu papel na resposta imune parece ser mais dependente da enzima INOS (do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthases*, Óxido Nítrico Sintase Induzível) através da ação do óxido nítrico (RENG e colaboradores, 2008; 2009). A capacidade de resposta aos estímulos por CTMs deve-se, em grande parte, pelo estímulo mediado por Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (HAN e colaboradores, 2011), embora outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas 1 $\alpha$  e 1 $\beta$  (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) também possam atuar juntamente nesse processo (HAN e colaboradores, 2011; REN e colaboradores, 2008). Em outro estudo, demonstrou-se um papel central da proteína CD274 ou B7-H1 em camundongos. As CTMs são capazes de expressar B7-H1 após estimulação por IFN- $\gamma$  e a inibição de B7-H1 parece abolir a capacidade imunossupressora das CTMs (SHENG e colaboradores, 2008). Evidenciou-se um papel importante de metaloproteinases, principalmente MMP-2 (metaloproteinase 2 da matriz) e MMP-9 (metaloproteinase 9 da matriz), na capacidade de inibição de CTMs quando co-transplantadas com ilhotas pancreáticas alogênicas em camundongos (DING e colaboradores, 2009). NEMETH e colaboradores, 2009, demonstraram o efeito da produção de Prostaglandina E-2 (PGE2) por CTMs sobre macrófagos em um modelo de sepsis. As CTMs foram capazes de estimular a produção de IL-10 por macrófagos *in vivo*, diminuindo a mortalidade dos camundongos por sepsis induzida.

### **3 ESTUDO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Introdução**

As CTMs têm sido utilizadas em diversos tipos de experimentos científicos devido ao seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, seu fácil isolamento e manuseio *in vitro* e sua sensibilidade elevada a moléculas sinalizadoras (CAPLAN e BRUDER, 2001). O seu papel na modulação da resposta imune pode representar uma importante alternativa terapêutica em casos de doenças auto-imunes, processos inflamatórios ou transplante de órgãos, mas para isso, um melhor entendimento do seu mecanismo de ação torna-se necessário.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar as CTMs de diferentes tecidos/órgãos de camundongos, além de padronizar as reações de PCR quantitativo (qPCR) com a utilização de macrófagos como controle positivo dos genes utilizados. A análise da expressão dos genes padronizados neste trabalho possibilitará a avaliação das diferenças na capacidade de resposta imune, dependendo do órgão de origem das células de camundongo.

#### **3.2 Materiais e métodos**

##### **3.2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos das linhagens C57Bl/6, machos, com idades entre 2-3 meses, obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) (Figura 1). O manejo dos animais foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). As CTMs murinas foram coletadas do rim, pâncreas, pulmão, gordura, aorta e baço, imediatamente após o sacrifício, realizado por deslocamento cervical. O isolamento foi realizado de acordo com a metodologia previamente descrita (MEIRELLES e colaboradores, 2006).

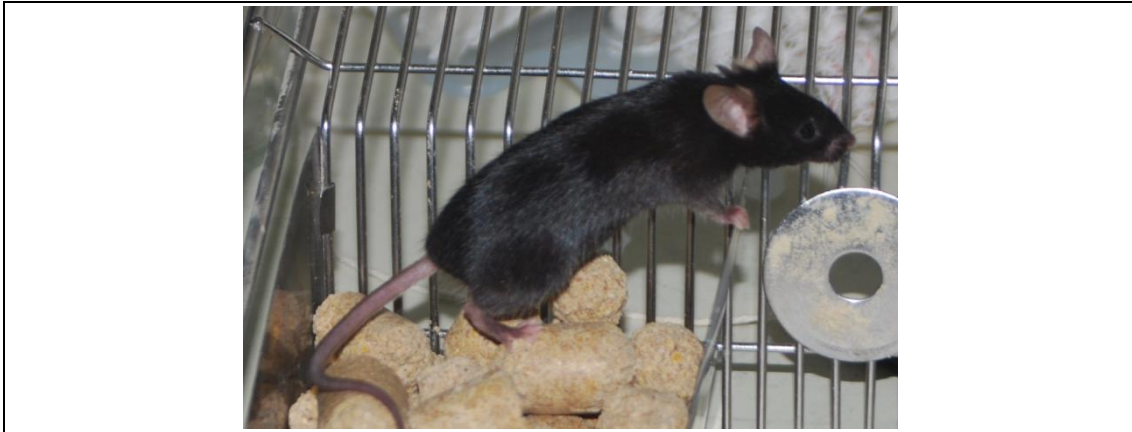


Figura 1 - Fotografia de camundongo da linhagem C57Bl/6 utilizado nos experimentos.

### 3.2.2 Meios e reagentes

O meio Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), foi utilizado como meio base. Para o cultivo celular foi utilizado DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (ambos da Gibco).

As diferenciações celulares foram realizadas com a utilização dos meios específicos. O meio de diferenciação osteogênico foi composto de meio base com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 50 mM 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, por ser mais instável, foi feito imediatamente antes da sua utilização, sendo composto por meio DMEM adicionado de 20% de soro fetal bovino,  $10^{-8}$  M de dexametasona, 2,5  $\mu$ g/mL de insulina de pâncreas bovino, 100  $\mu$ M de indometacina e 5  $\mu$ M de rosiglitazona. Todos os indutores de diferenciação utilizados eram da Sigma-Aldrich.

### 3.2.3 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais e macrófagos murinos

Os órgãos e tecidos foram coletados de maneira asséptica, transferidos para uma placa de Petri estéril e cortados em pequenos fragmentos para então serem digeridos com 1 mg/mL de colagenase tipo I (Gibco) diluída em meio DMEM sem soro, durante 45 minutos. Para inativar a enzima, foi utilizado meio suplementado. As células foram separadas dos restos celulares por centrifugação a 300 g 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 0,25% tripsina-EDTA (Gibco) quando confluentes. Subsequentemente, as passagens celulares foram realizadas para a continuidade da expansão cultura.

O cultivo de macrófagos foi realizado através do plaqueamento de células da medula óssea de camundongos nas mesmas condições utilizadas para o cultivo de células-tronco mesenquimais. Após 7 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e incubadas com anticorpo anti-CD11b para isolamento dos macrófagos por FACS (*cell sorting*) utilizando o equipamento FACS Aria III. Um total de  $10^6$  células foram ressuspensas em PBS contendo 0,1% de BSA e 2 mM EDTA e incubadas com 8  $\mu$ L de anticorpo. Após 30 min, as células foram lavadas, para eliminar os anticorpos não ligados, e ressuspensas em PBS contendo BSA e EDTA. As células foram separadas de maneira asséptica e cultivadas novamente em placas de 6 poços. Após 24 h os macrófagos foram ativados com 100 U/mL de IFN- $\gamma$  (Peprotech) e 10 ng/mL de lipopolisacarídeos (Sigma) por 24 h.

#### 3.2.4 Diferenciação celular

Quando as células encontravam-se entre a quarta e quinta passagens, as mesmas foram transferidas para uma placa de 12 poços, distribuídos da seguinte forma: três poços com meio de diferenciação adipogênico, três poços com meio de diferenciação osteogênico e seis poços com meio suplementado, como controle negativo (Figura 2). A troca de meio foi realizada a cada 3-4 dias.

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 primeiras duas colunas de poços (meio adipogênico e controle 1) para corar os vacúolos de gordura. Após cinco minutos de contato com o corante, os poços foram lavados com água e colocados em contato com hematoxilina por 5 min, para corar o núcleo das células, possibilitando uma melhor visualização. Nos poços restantes (meio osteogênico e controle 2) foi utilizado apenas *Alizarin Red S* para colorir a matriz de cálcio.

Após a revelação, as células foram analisadas em microscópio invertido e as fotos tiradas utilizando aumento de 200x.



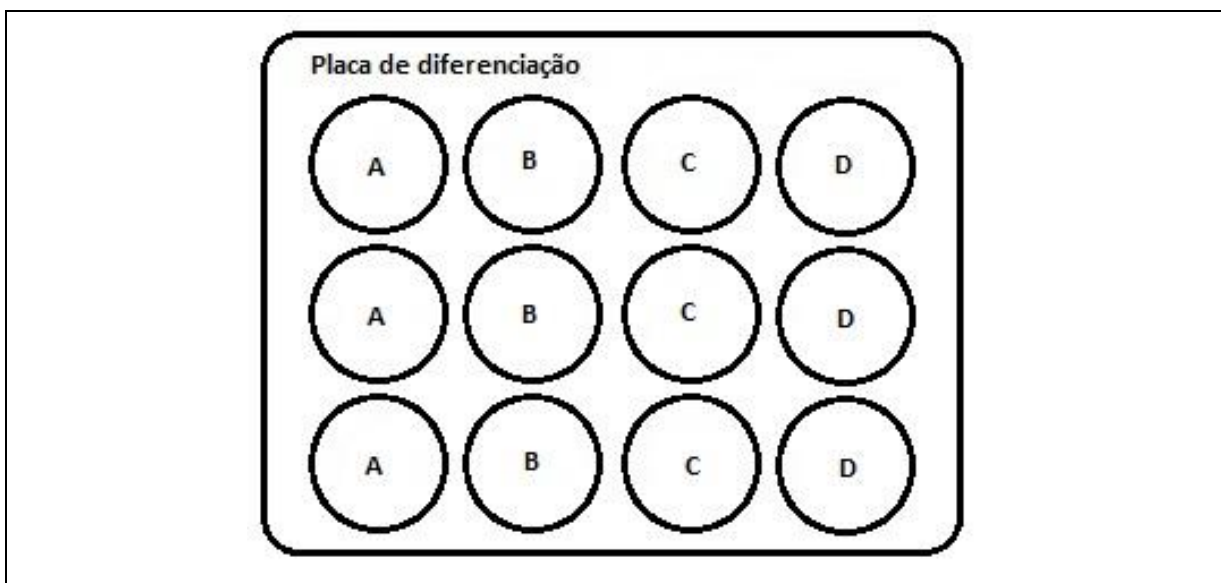


Figura 2 - Disposição dos meios utilizados na placa de 12 poços para diferenciação das culturas de células-tronco mesenquimais. Todos os poços continham células provenientes do mesmo órgão na quarta ou quinta passagens. Nos poços A e C as células foram mantidas com os meios de diferenciação adipogênico e osteogênico, respectivamente. Nos poços B e D as células foram mantidas em meio suplementado e utilizadas como controle negativo das respectivas diferenciações.

### 3.2.5 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 ficoeritrina. Após tripsinização, as células foram ressuspensas na concentração de  $10^5$  células/tubo com solução tamponada de fosfato (PBS) e incubadas com os anticorpos por 30 min a 4° C. Após, as células foram lavadas com PBS para remover o excesso de anticorpos não ligados. A análise foi feita em um citômetro fluxo (FACS Aria III, Becton Dickinson), e os gráficos gerados no programa WinMDI, versão 9.2.

### 3.2.6 Padronização das reações de PCR quantitativo (qPCR)

O RNA total foi extraído de culturas de macrófagos ativados pelo método de fenol/clorofórmio utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

Ao final da extração, o RNA foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O cDNA foi sintetizado com kit MML-V RT (Invitrogen) utilizando 150 ng/reacção de *primers* randômicos. A padronização das reacções de PCR quantitativo foi realizada com o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen). Para tal, o cDNA foi diluído em água de injeção de maneira seriada (fator de diluição de 10X) para montagem das curvas. Os *primers* foram desenhados de maneira a flanquear um *intron*, o que impede a amplificação de DNA genômico. As corridas foram realizadas no aparelho StepOne Plus (Life Technologies). Cada reacção de 20 µL era composta por 10 µL do *master mix* (contendo tampão, SYBR, dNTPs, polimerase), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 nM ROX, 0.5 µM de cada *primer* e 1 µL de cDNA. O programa de dois passos utilizado foi: desnaturaçãõ a 95° C por 5 min seguido de 40 ciclos de 95° C por 10 s, 60° C por 20 s e um ciclo final de desnaturaçãõ de 70° C por 10 min. As amostras foram amplificadas em triplicata. A eficiência das reacções foi calculada para cada conjunto de *primers* (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos conjuntos de *primers* utilizados.

Código	Gene	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	GC %	Tamanho fragmento (pb)
NM_007393.3	ActB	CACACCCGCCACCAGTTTCGC	62	70	70
		ACATGCCGGAGCCGTTGTTCG	62	65	
NM_008084.2	Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	61	52	123
		TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	59	43	
NM_010927	Inos	CTTTGCCACGGACGAGAC	58	61	67
		GTCATTGTACTCTGAGGGCTGA	59	50	
NM_021893	CD274	AGGGCAAACCACACAGC	59	55	80
		GCACCCAGTGAGTCCTGTTC	60	60	
NM_008610.2	Mmp2	ATAACCTGGATGCCGTCGT	59	52	102
		TCACGCTCTTGAGACTTTGG	58	50	
NM_031168.1	Il-6	TCTAATTCATATCTTCAACCAAGAG	56	32	119
		TGGTCCTTAGCCACTCCTTC	59	55	
NM_126166.4	Tlr3	TTGTCTTCTGCACGAACCTG	55	58	205
		CGCAACGCAAGGATTTTATT	55	56	
NM_021297.2	Tlr4	CAAGAACATAGATCTGAGCTTCAACCC	61	44	278
		GCTGTCCAATAGGGAAGCTTTCTAGAG	62	48	

### 3.3 Resultados

O procedimento de isolamento das CTMs de diferentes órgãos de camundongos foi possível de ser realizado e padronizado no laboratório de Hematologia e Células-tronco da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Nos dois primeiros isolamentos realizados foi utilizada colagenase preparada previamente e congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nesses isolamentos foram constatados problemas no rendimento, resultando em baixo número de células aderidas as placas (dados não mostrados). Esse problema foi resolvido após ser utilizada solução de colagenase tipo 1 fresca, preparada poucas horas antes do uso.

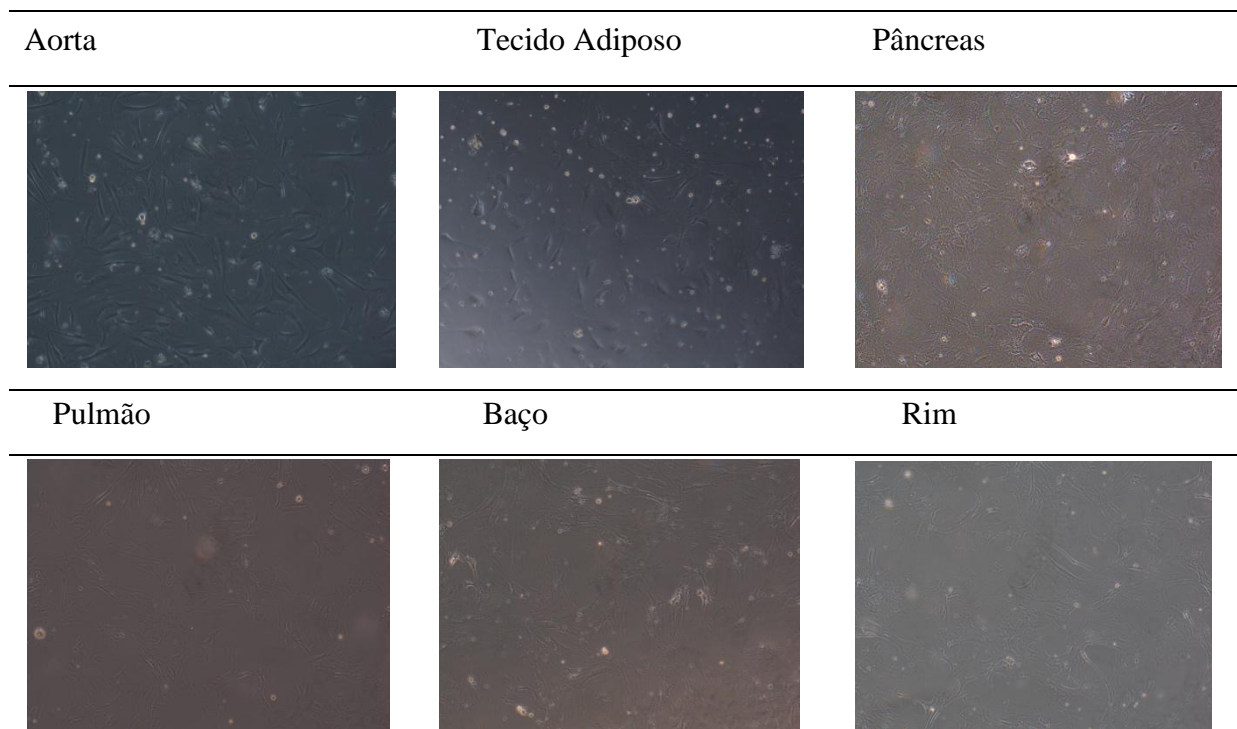
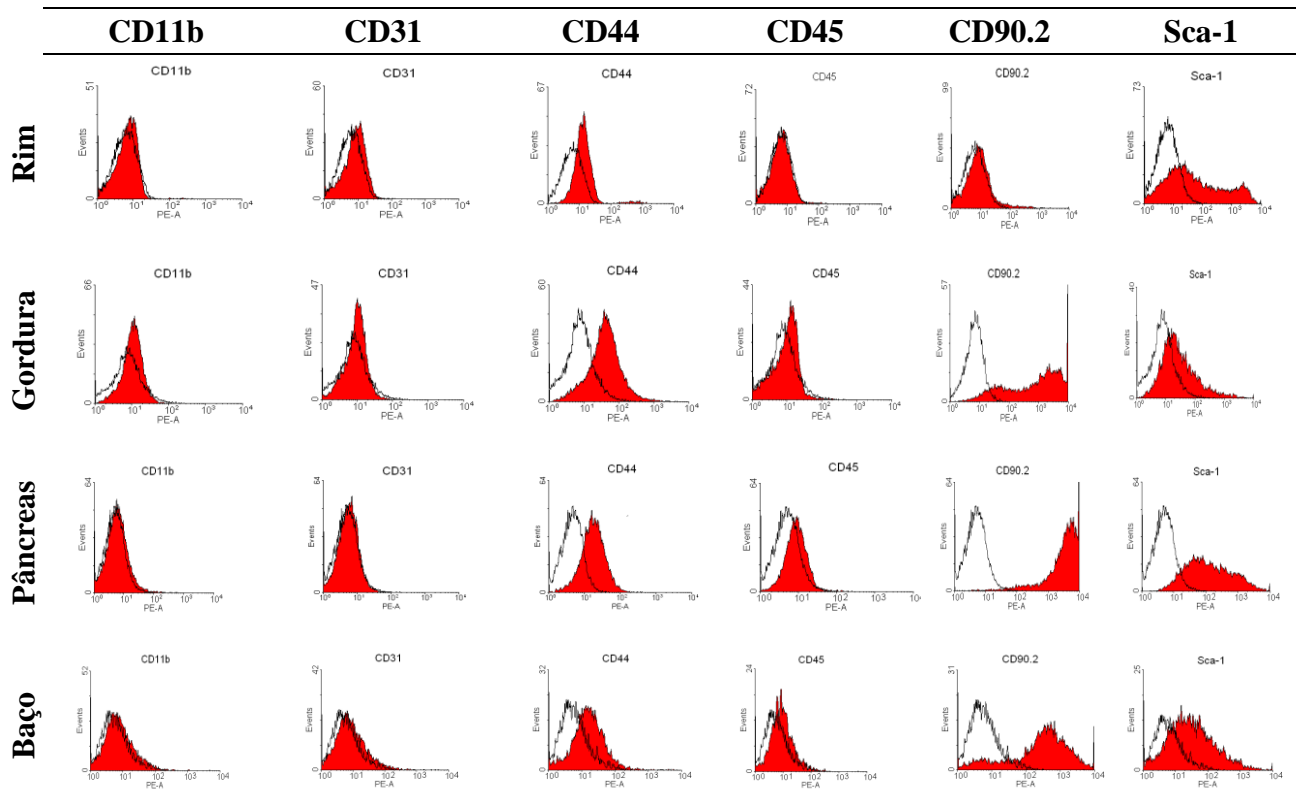


Figura 3 - Imagens de microscopia mostrando a morfologia das CTMs isoladas de aorta, tecido adiposo, pâncreas, pulmão, baço e rim. Aumento de 200x.

Os dados mostrados nesse trabalho são referentes às culturas isoladas do terceiro e quarto camundongos, onde foi possível isolar eficientemente as células e realizar as passagens de maneira eficiente. Foi possível isolar células de todos os órgãos coletados desses animais. No isolamento do quinto e sexto camundongos foram encontrados problemas atribuídos à

concentração da tripsina, visto que quando as passagens foram realizadas, uma quantidade significativa de células morria durante o procedimento, o que reduziu o número de linhagens utilizadas nos experimentos. As células isoladas apresentaram morfologia característica de células-tronco mesenquimais murinas, com aspecto semelhante a fibroblastos quando aderidas às placas de cultura (Figura 3).

A análise dos marcadores de superfície demonstrou que mais de 95% das células provenientes dos diferentes órgãos eram negativas para os marcadores CD11b, CD31 e CD45. Esses marcadores identificam especificamente macrófagos, células endoteliais e a maioria das células sanguíneas. As culturas apresentaram variação bastante evidente na frequência de células CD90.2, Sca-1 e CD44 (Figura 4). A frequência de células positivas para o marcador CD90.2, por exemplo, foi alta no pâncreas, baço, aorta e gordura, não sendo expresso no rim. O marcador Sca-1 mostrou-se bastante variável em todos os órgãos, com frequência baixa nas culturas de gordura, pulmão e aorta. A expressão de CD44 foi semelhante em todas as linhagens, embora esse marcador pareça ter expressão baixa pelas células (Tabela 2).



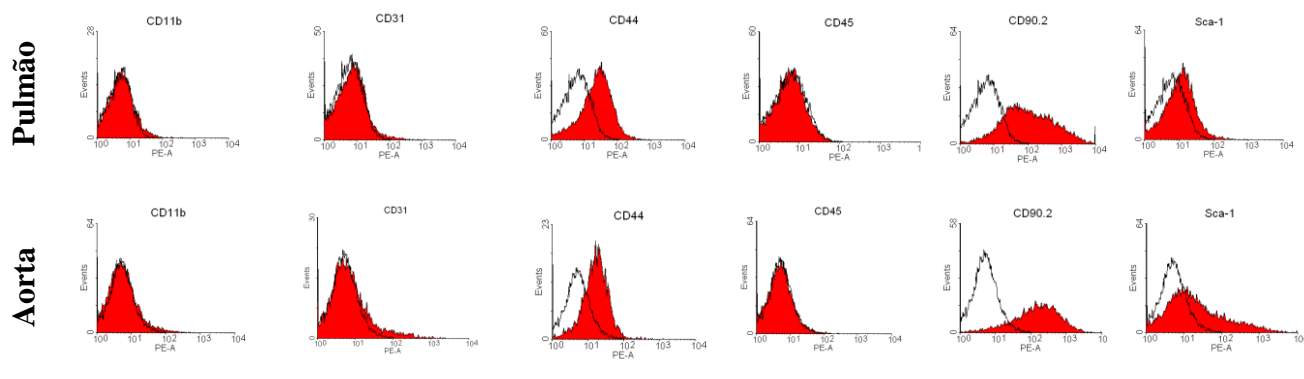
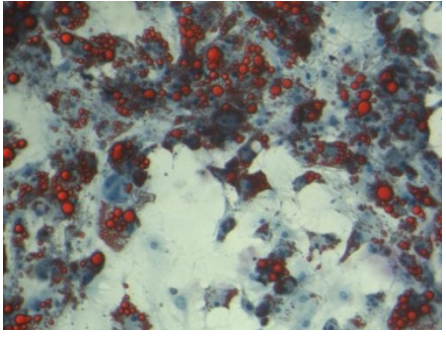
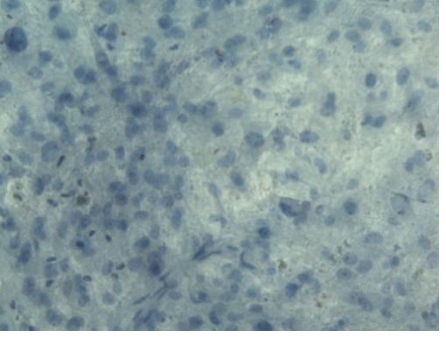
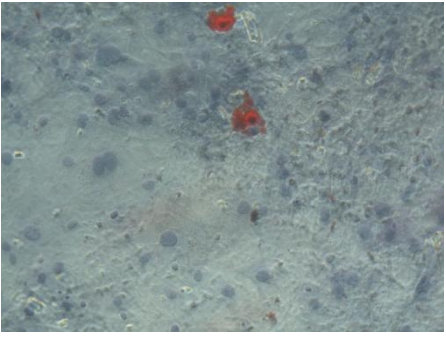
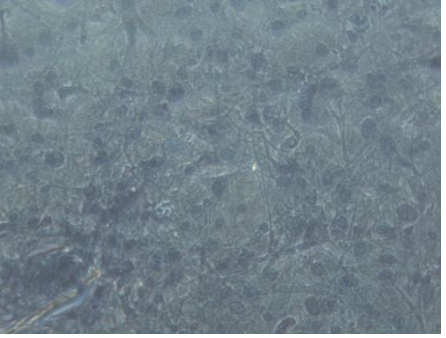
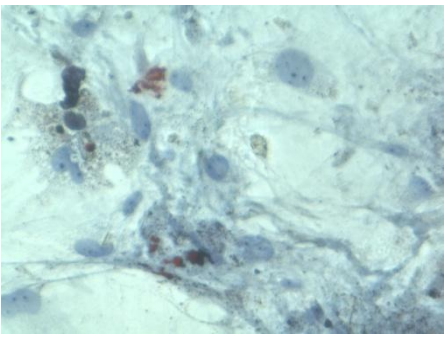
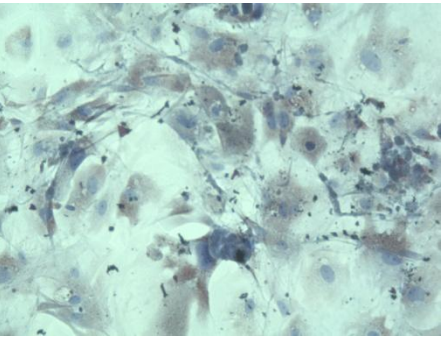
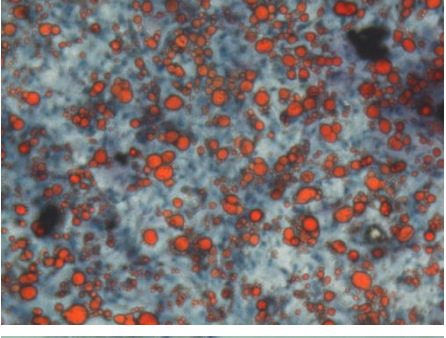
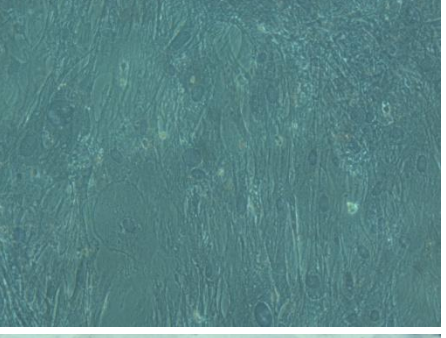
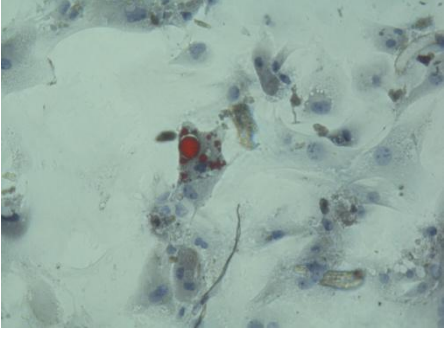
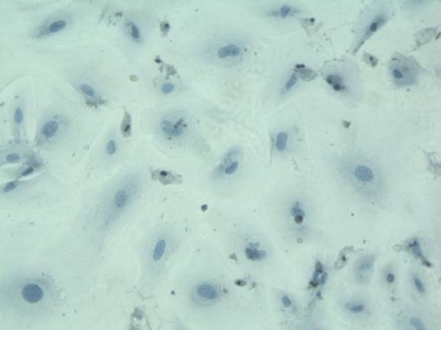


Figura 4 - Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais isoladas de rim, tecido adiposo, pâncreas, baço, pulmão e aorta analisadas com os anticorpo anti-CD11b, -CD31, CD44, CD45, CD90.2 e Sca-1.

Tabela 2 – Quantidade de células positivas na imunofenotipagem (%).

Órgão	CD90	CD44	Sca-1	Não Marcadas
<b>Pâncreas</b>	98,3	25,3	77,5	0,7
<b>Aorta 1</b>	88,9	23,7	17	0,7
<b>Aorta 2</b>	77	20,6	30,8	0,4
<b>Rim</b>	5,6	5	51,7	0,2
<b>Pulmão</b>	70,1	29,1	4,8	0,2
<b>Gordura</b>	81,3	33,1	25,7	0,5

A análise da capacidade de diferenciação das culturas mostrou que todas as linhagens testadas apresentaram capacidade de diferenciação adipogênica, apresentando, após trinta dias no meio de indução, vacúolos lipídicos intracelulares, que foram corados pelo *Oil Red O* (Figura 5). As células mantidas no meio de diferenciação osteogênico passaram a depositar uma matriz de cálcio, que foi evidenciada pela coloração com *Alizarin Red S* (Figura 6). Houve diferença na quantidade de células diferenciadas dependendo do órgão utilizado no isolamento, principalmente na diferenciação adipogênica. As células provenientes do pulmão, rim e gordura, por exemplo, mostraram uma maior facilidade para diferenciação adipogênica, enquanto que as células provenientes do pâncreas, baço e aorta apresentaram um menor número de células com vacúolos lipídicos.

Tecido/ Órgão	Meio Adipogênico	Controle Adipogênico
Aorta 1		
Aorta 2		
Baço 1		
Gordura 1		
Pâncreas 2		

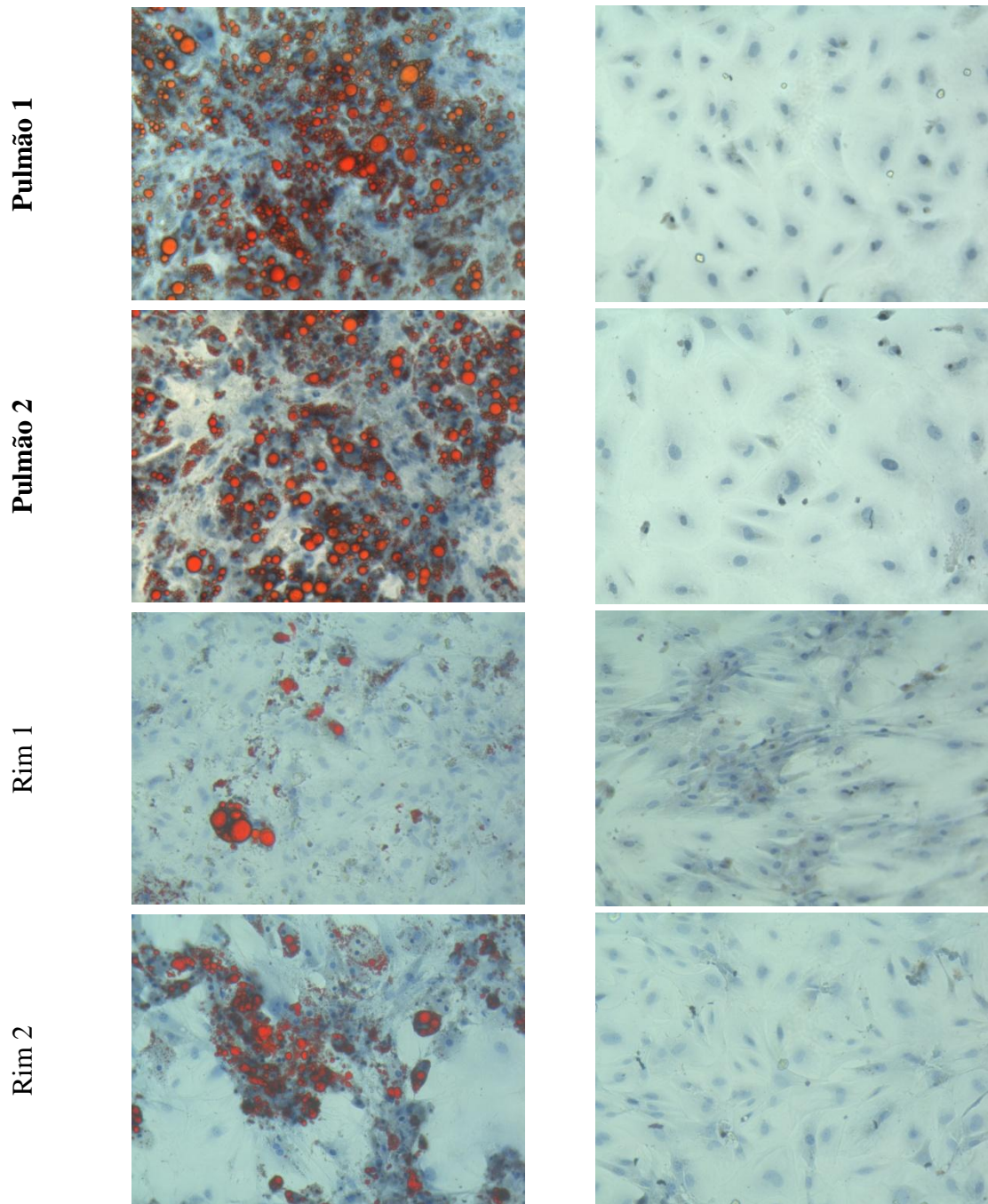
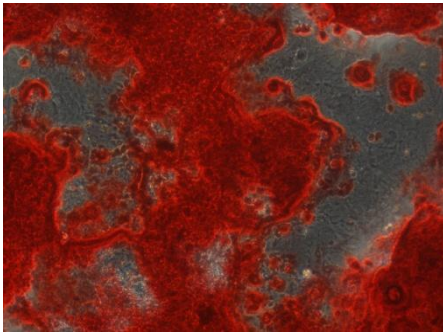
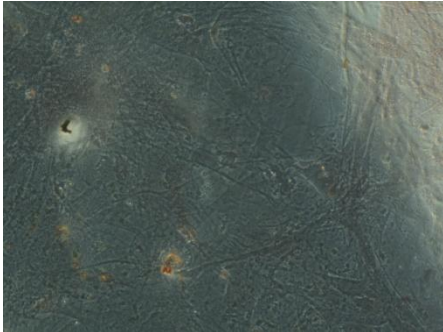
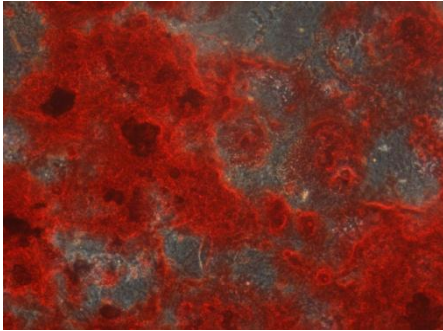
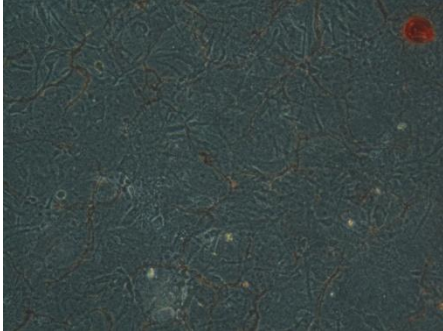
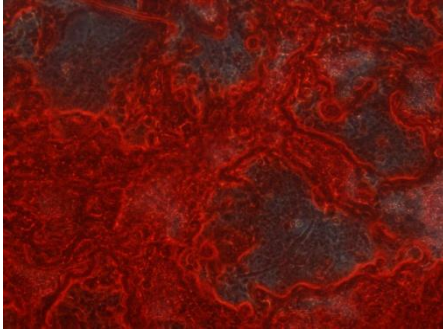
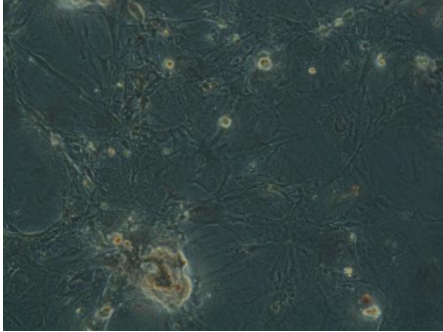
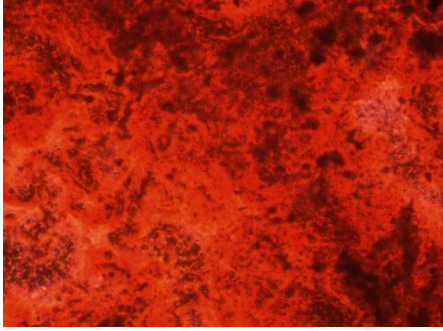
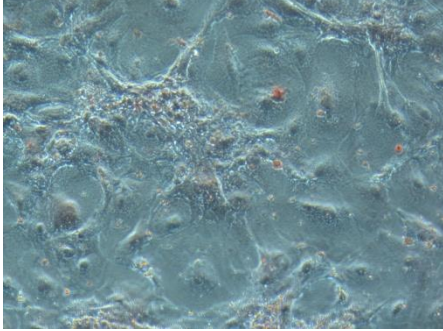
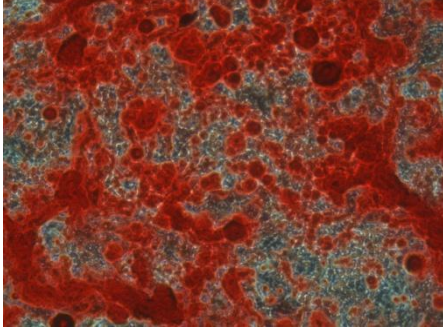
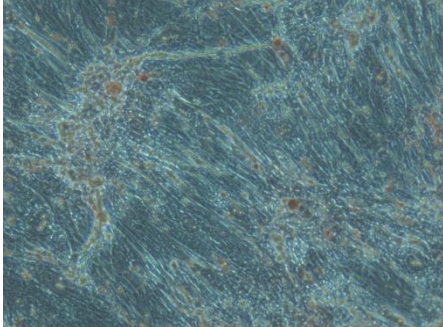
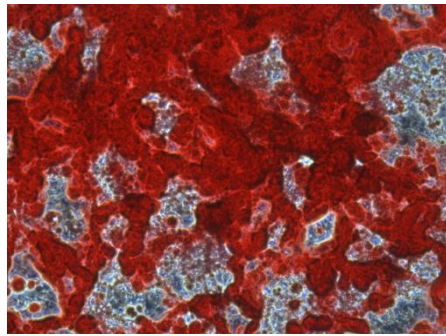


Figura 5 - Imagens de culturas de CTMs isoladas de diferentes órgãos de camundongos diferenciadas por 3-4 semanas em um fenótipo adipogênico e culturas controle, coradas com *Oil Red O*. Aumento de 200x.

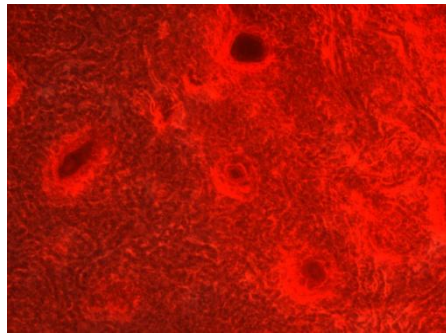
Tecido	Meio Osteogênico	Controle Osteogênico
Aorta 1		
Aorta 2		
Baço 1		
Baço 2		
Gordura		



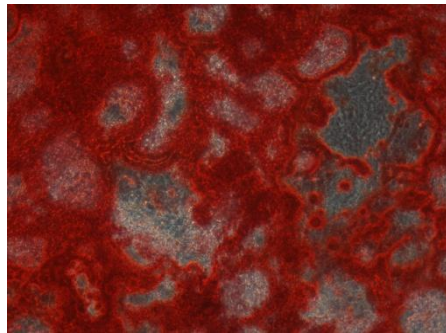
**Pâncreas 1**



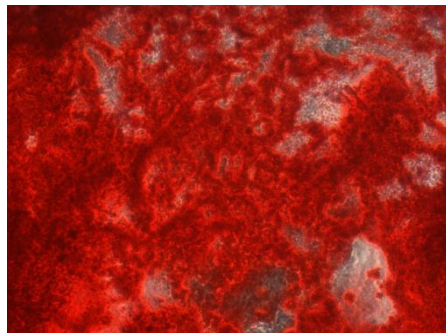
**Pâncreas 2**



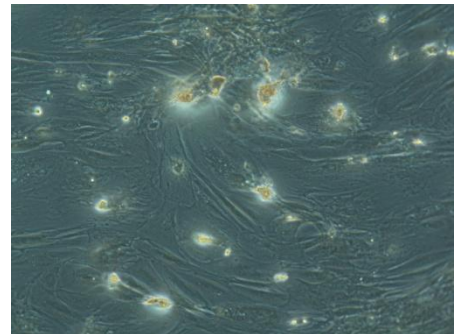
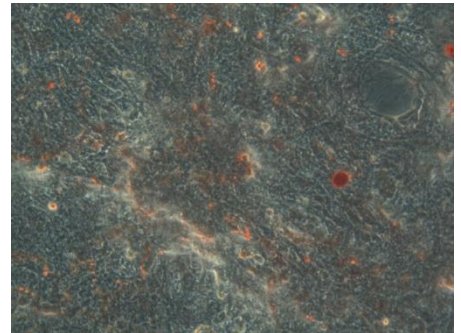
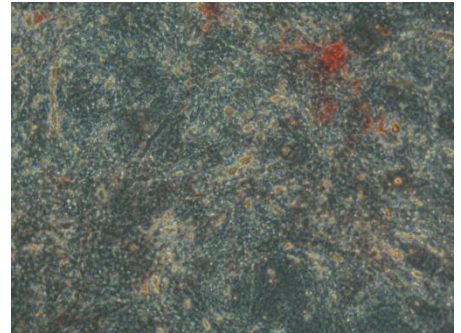
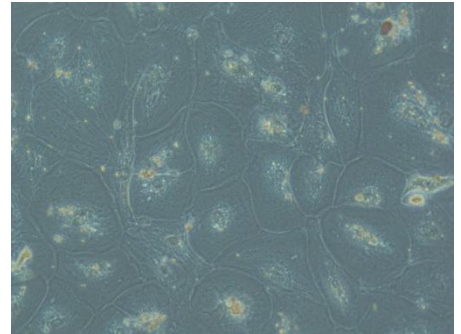
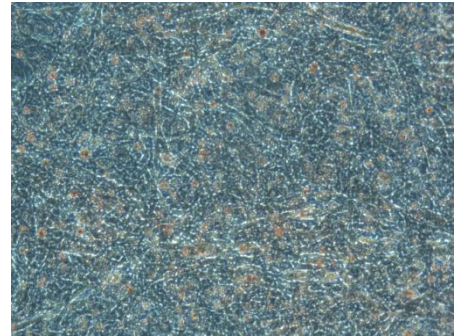
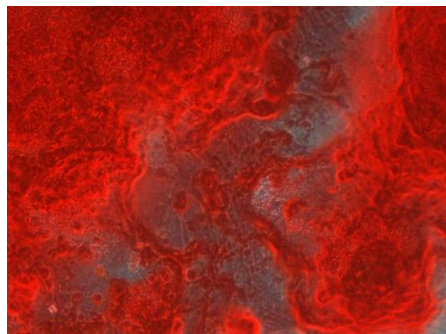
**Pulmão 1**



**Pulmão 2**



**Rim 1**



**Rim 2**

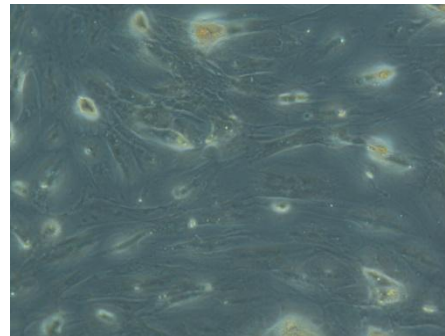
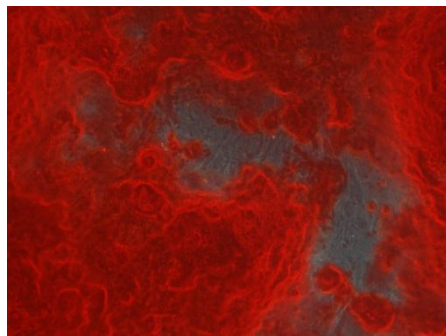
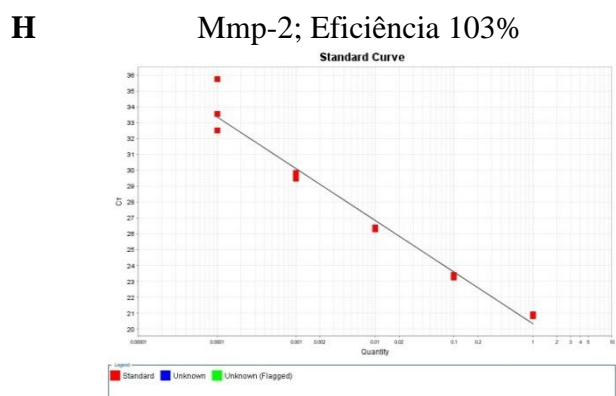
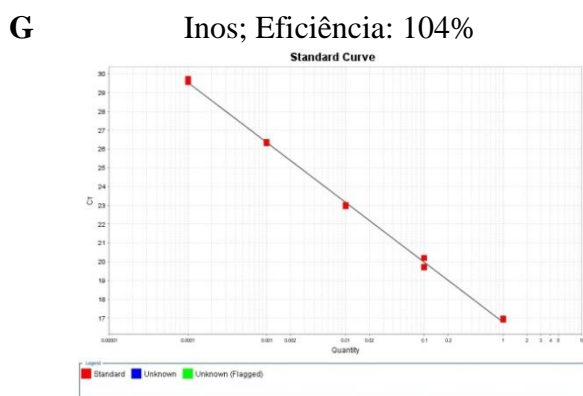
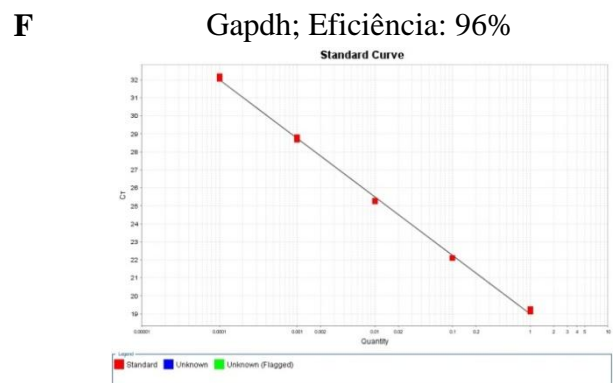
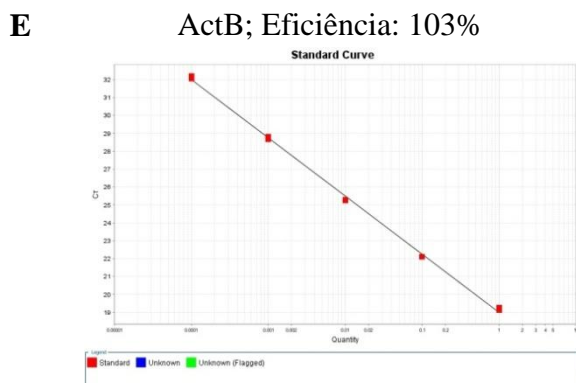
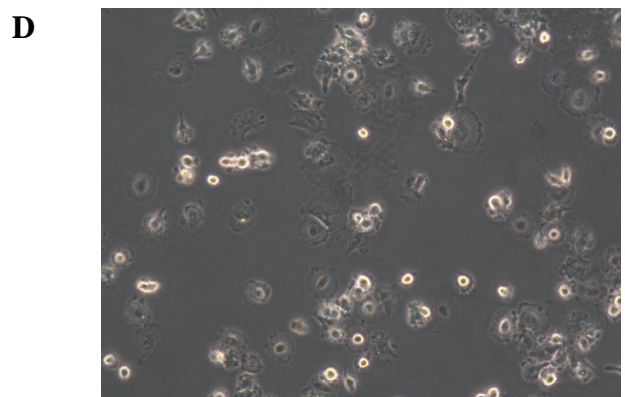
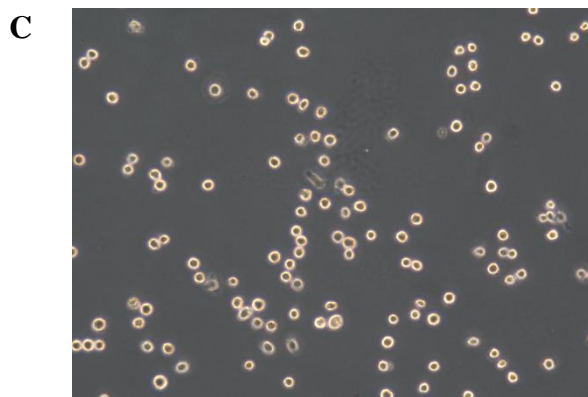
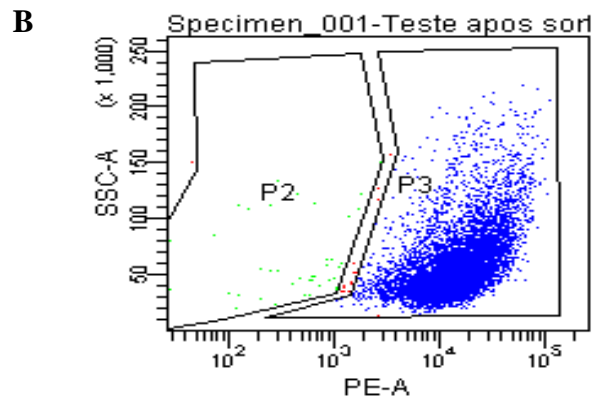
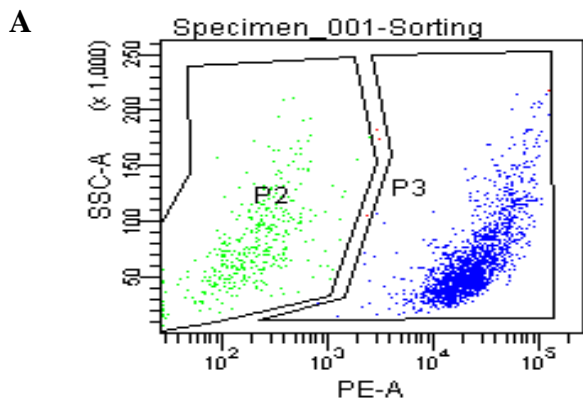


Figura 6 - Imagens de culturas de células-tronco mesenquimais isoladas de diferentes órgãos de camundongos diferenciadas por 3-4 semanas em um fenótipo osteogênico e culturas controle, coradas com *Alizarin Red S*. Aumento de 200x.

Em uma segunda etapa do trabalho, foi realizada a padronização das reações de PCR quantitativo para genes envolvidos na modulação da resposta imune de células-tronco mesenquimais.

A Figura 7 apresenta os resultados do experimento de padronização das reações de qPCR. Em uma primeira etapa, as células da medula óssea de camundongos foram isoladas e cultivadas por 7 dias. Após, foram separadas por *cell sorting* através de Citometria de Fluxo, sendo os macrófagos separados de outros tipos celulares através do marcador CD11b, conforme demonstrado na Figura 7. O gráfico da Figura 7A apresenta as duas populações de células, sendo a P2 negativa e a P3 positiva para o marcador CD11b. Após a separação, a frequência de células CD11b+ passou de 82,6 para 99,3 %, mostrando uma alta eficiência de separação por essa técnica. As figuras 7C e 7D representam os macrófagos antes e após a ativação com IFN- $\gamma$  e LPS, respectivamente.

As Figuras 7D, 7E, 7F, 7G, 7H e 7I, representam respectivamente as curvas de amplificação para os genes ActB, Gapdh, Inos, Mmp2, Il-6 e CD274. As eficiências de amplificação para essas reações foram ActB= 103%, Gapdh= 96%, Inos= 104%, Mmp-2= 103%, Il-6= 105% e CD274=104%.



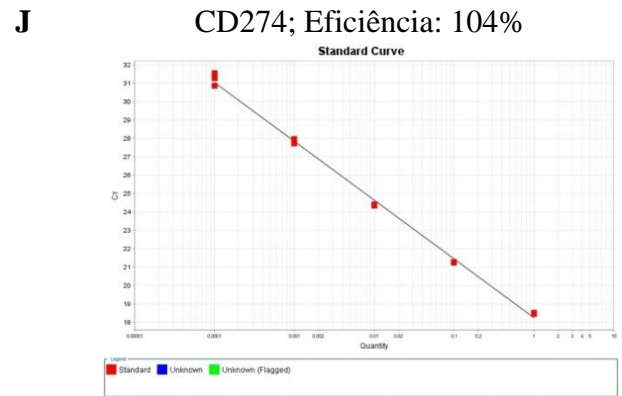
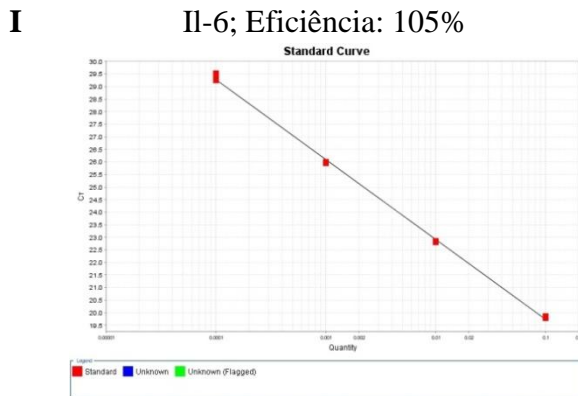


Figura 7 - Purificação de macrófagos a partir de culturas de medula óssea de camundongo por *cell sorting* mostrando em (A) o gráfico das células antes da separação e em (B) após a separação em citômetro de fluxo. As Figuras (C) e (D) apresentam a morfologia de macrófagos antes e após a ativação com 100 U/ml de IFN- $\gamma$  e 10 ng/ml de LPS, respectivamente. A padronização das reações de PCR quantitativo utilizando os *primers* específicos para (E) ACTB, (F) GAPDH, (G) INOS, (H) MMP2, (I) IL-6 e (J) CD274. Os gráficos (E-J) mostram a amplificação dos transcritos obtidas através da diluição do cDNA de macrófagos ativados. Aumento 200 X para as Figuras 7C e 7D.

Os resultados preliminares da análise por qPCR demonstraram que as CTMs isoladas de pâncreas e pulmão expressaram receptores Tlr3 e Tlr4, mostrando que essas células são potencialmente capazes de reconhecer moléculas presentes em patógenos (Figura 8).

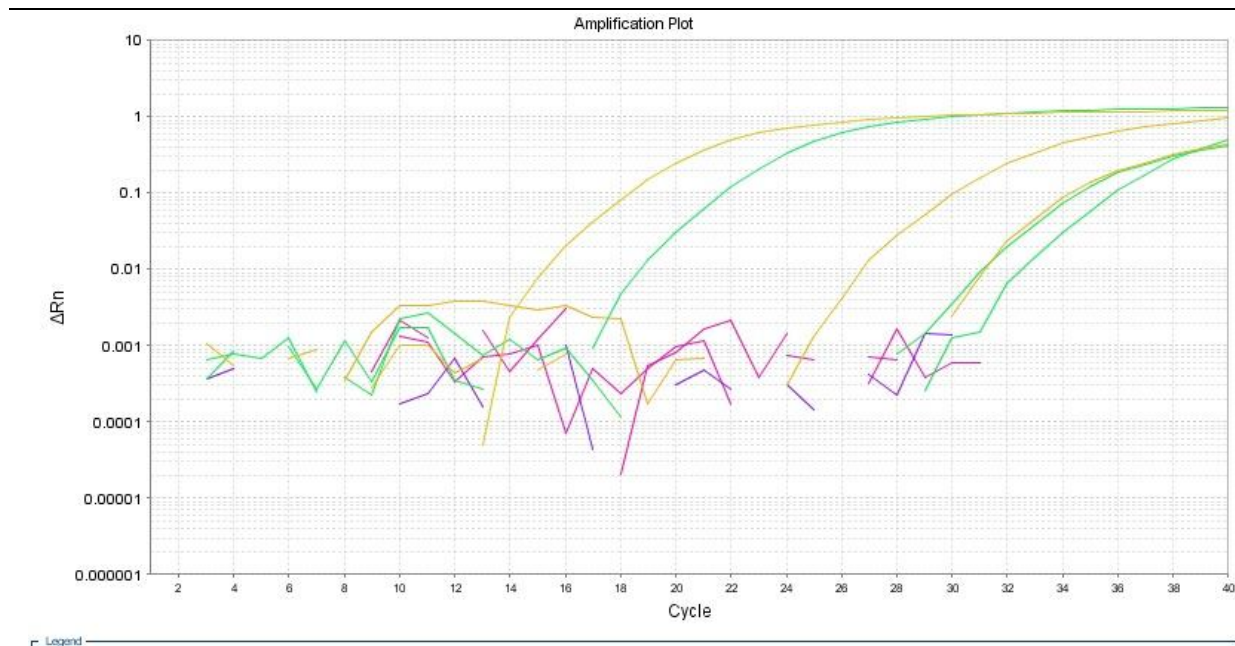


Figura 8 - Resultados preliminares da expressão de ACTB, TLR3 e TLR4 em CTMs isoladas de pâncreas e pulmão por PCR quantitativo.

### 3.4 Discussão

Os estudos em terapia celular, assim como em muitas outras áreas, beneficiam-se enormemente da utilização de modelos animais para estudos pré-clínicos, principalmente em modelos de doenças. Os camundongos estão entre os modelos animais mais utilizados em pesquisas. A linhagem de camundongos C57Bl/6 foi escolhida por ser de camundongos isogênicos (geneticamente idênticos), o que oferece vantagens para futuros estudos em modelos animais no laboratório.

Embora deficiências e limitações dos modelos animais sejam conhecidas, esses modelos são fundamentais para impulsionar e acelerar as descobertas científicas atuais. Nesse trabalho, utilizou-se o modelo murino para o isolamento de CTMs de diferentes tecidos e órgãos, o que só seria possível em humanos se fossem utilizadas células de pacientes cadavéricos. O isolamento de culturas de células aderentes dos diferentes órgãos de camundongos C57Bl/6, com morfologia semelhante aos fibroblastos, expressão de marcadores de superfície característicos de CTMs, bem como potencial de auto-renovação e

diferenciação em células da linhagem mesenquimal está de acordo com os resultados observados na literatura para esse tipo celular (MEIRELLES e colaboradores, 2008).

Embora a morfologia das células isoladas de todos os órgãos tenha sido semelhante, houver variações na quantidade de células diferenciadas quando expostas aos meios de indução adipogênico e osteogênico. Essas variações são esperadas no cultivo de CTMs murinas e podem ter relação com o ambiente no qual as células se originam (FUCHS, TUMBAR, GUASCH, 2004). Um exemplo desse fenômeno foi a grande quantidade de adipócitos formados na diferenciação adipogênica a partir de culturas de CTMs isoladas de tecido adiposo, enquanto as culturas isoladas do baço e pâncreas apresentaram poucos vacúolos lipídicos após a indução (Figura 5). Com relação à diferenciação osteogênica, não foram observadas diferenças aparentes, visto que todas as culturas diferenciaram-se eficientemente, com deposição de matriz de cálcio (Figura 6).

Os resultados da imunofenotipagem por citometria de fluxo mostraram que as culturas analisadas nas passagens 4 e 5 já estavam livres de grande parte dos contaminantes celulares que poderiam crescer juntamente com as CTMs (Figura 4). Esse fato foi observado mesmo em culturas que apresentaram grande potencial para contaminação com macrófagos como, por exemplo, ocorre em culturas isoladas de baço, órgão onde reside um grande número de macrófagos. Esses resultados sugerem que a utilização de células nessas passagens é adequada para os testes futuros de análises da expressão de genes envolvidos na resposta imune. O processo de eliminação dos contaminantes ocorre através da tripsinização, que permite a proliferação das células-tronco em relação a outros tipos menos ativos. Essa característica proliferativa das CTMs acaba purificando a amostra, dado que células contaminantes não conseguem proliferar da mesma maneira e acabam sendo removidas no processo de remoção do sobrenadante.

Os resultados com os dois primeiros animais não permitiram o isolamento eficiente de CTMs, o que foi resolvido através da utilização de colagenase preparada no mesmo dia da utilização. Esse processo garantiu que, nos isolamentos subsequentes, um número maior de células pudesse ser isolado dos animais.

Foram encontradas também dificuldades na passagem das células durante o processo de expansão das culturas celulares. Acredita-se que a concentração de tripsina utilizada para a passagem de células humanas, que é feita com tripsina a 0,25%, pode ter sido muito alta, trazendo efeitos deletérios para as culturas murinas na hora da tripsinização. Concentrações

mais baixas de tripsina estão sendo testadas para evitar uma morte celular alta durante as passagens.

Demonstrou-se uma expressão dos receptores Toll-like 1 ao 8 em CTMs isoladas da medula óssea de camundongos, com exceção do receptor toll-like 9, o qual não era expresso (PEVSNER-FISCHER e colaboradores, 2007). Acredita-se que a expressão de Tlr3 e Tlr4 apresentada pelas duas linhagens analisadas nesse trabalho também poderá ser repetida nas culturas de CTMs isoladas dos demais órgãos. Devido as similaridades encontradas entre CTMs de diferentes órgãos, pode-se sugerir que é bastante provável que a capacidade de modulação imune das CTMs não esteja restrita às células da medula óssea ou tecido adiposo, mas seja um importante papel desempenhado por CTMs *in vivo* localizadas na vasculatura de tecidos e órgãos (MEIRELLES e colaboradores, 2008).

Por fim, os resultados obtidos com a padronização das eficiências de reações utilizando cDNA, obtidos de culturas de macrófagos ativados, demonstram eficiências variando de 96 a 105%, o que está no intervalo recomendado na literatura. Eficiências abaixo de 95% ou acima de 105% tornam difíceis as comparações da expressão de genes e a normalização dos resultados, aumentando o erro dos ensaios.

### **3.5 Conclusão do estudo experimental**

A metodologia empregada nesse trabalho possibilitou o isolamento de células aderentes com morfologia de células-tronco mesenquimais. A caracterização dessas células por imunofenotipagem e diferenciação *in vitro* confirmou a identidade das culturas isoladas.

Dependendo do local de origem das células, foi possível observar variações no fenótipo e na capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica das células.

A purificação de macrófagos a partir de células da medula óssea de camundongos por *cell sorting* permitiu a padronização de genes envolvidos na resposta imune de CTMs que serão testados nas linhagens celulares isoladas.

Resultados preliminares em duas linhagens de CTMs analisadas apresentaram expressão de Tlr3 e Tlr4, sugerindo que esses receptores estão expressos em CTMs de diferentes tecidos e órgãos. Com isso, sugere-se que as CTMs dos diversos órgãos possam reconhecer moléculas presentes em patógenos, apresentando uma importante função na modulação da resposta imune.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Tendo em vista que foi possível isolar eficientemente populações de células-tronco mesenquimais dos órgãos murinos propostos, bem como confirmar a capacidade de diferenciação e fenótipo dessas células, o presente trabalho tem como perspectiva aumentar o número amostral para confirmação dos resultados. Como continuidade do presente estudo, as células serão submetidas a diferentes condições de cultivo com lipopolisacarídeos, IFN- $\gamma$  e poliI:C para avaliação da expressão diferencial dos genes já padronizados nesse trabalho. Essas análises irão ajudar na compreensão dos mecanismos de ação das CTMs na modulação da resposta imune, permitindo a futura elaboração de protocolos pré-clínicos com as CTMs. A ampliação do conhecimento referente à biologia das células-tronco mesenquimais poderá trazer benefícios além da regeneração tecidual, como a redução da rejeição em transplantes e auxílio no tratamento de doenças auto-imunes.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.
- BRETZEL, R.G.; ECKHARD, M.; BRENDEL, M.D. Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. **Panminerva Med**, v. 46, p. 25-42, 2004.
- BJORNSON, C.R.R.; RIETZE, R.L.; REYNOLDS, B.A.; MAGLI, M.C.; VESCOVI, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. **Science**, v. 283, p. 534-537, 1999.
- BUNNELL, B.A.; BETANCOURT, A.M.; SULLIVAN, D.E. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 1, p. 34, 2010.
- CAPLAN A.I.; BRUDER S.P. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, p. 259 –264, 2001.
- CARRIÓN, F.; NOVA, E.; LUZ, P.; APABLAZA, F.; FIGUEROA, F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. **Immunol Lett**, v. 135, p. 10-16, 2010.
- CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B.; CAMASSOLA, M. Biology and applications of mesenchymal stem cells. **Science Progress**, v. 93, p. 113–127, 2010.
- DAVANI, B.; IKONOMOU, L.; RAAKA, B.M.; GERAS-RAAKA, E.; MORTON, R.A.; MARCUS-SAMUELS, B.; GERSHENGORN, M.C. Human islet-derived precursor cells are mesenchymal stromal cells that differentiate and mature to hormone-expressing cells *in vivo*. **Stem Cells**, v. 25, p. 3215-3222, 2007.
- 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, p. 3838-3843, 2002.
- DING, Y.; XU, D.; FENG, G.; BUSHELL, A.; MUSCHEL, R.J.; WOOD, K.J. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. **Diabetes**, v. 58, p. 1797-1806, 2009.
- FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, p. 769-778, 2004.
- GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v.287, p. 1433-1438, 2000.

HAN, Z.; TIAN, Z.; LV, G.; ZHANG, L.; JIANG, G.; SUN, K.; WANG, C.; BU, X.; LI, R.; SHI, Y.; WU, M.; WEI, L. Immunosuppressive effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironment favours the growth of B16 melanoma cells. **J Cell Mol Med**, 15, p. 2343-2352, 2011.

KOPEN, G. C.; PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 10711-10716, 1999.

LEI, J.; WANG, Z.; HUI, D.; YU, W.; ZHOU, D.; XIA, W.; CHEN, C.; ZHANG, Q.; WANG, Z.; ZHANG, Q.; XIANG, A.P. Ligation of TLR2 and TLR4 on murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggers differential effects on their immunosuppressive activity. **Cell Immunol**, v. 271, p. 147-156, 2011.

MCKAY, R. Stem cells in the central nervous system. **Science**, v. 276, p. 66-71, 1997.

MEIRELLES L.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, p. 2204-2213, 2006.

MEIRELLES L.S.; CAPLAN A.I.; NARDI N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells** v.26, p. 2287-2299, 2008.

NÉMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P.S.; MAYER, B.; PARMELEE, A.; DOI, K.; ROBEY, P.G.; LEELAHAVANICHKUL, K.; KOLLER, B.H.; BROWN, J.M.; HU, X.; JELINEK, I.; STAR, R.A.; MEZEY, E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nat Med**, v. 15, p. 42-49, 2009.

PEVSNER-FISCHER, M.; MORAD, V.; COHEN-SFADY, M.; ROUSSO-NOORI, L.; ZANIN-ZHOROV, A.; COHEN, S.; COHEN, I.R.; ZIPORI, D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. **Blood**, v.109, p. 1422-1432, 2007.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** v. 284, p. 143-147, 1999.

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, 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**, v. 27, p. 1954-1962, 2009.

RENNER, P.; EGGENHOFER, E.; ROSENAUER, A.; POPP, F.C.; STEINMANN, J.F.; SLOWIK, P.; GEISSLER, E.K.; PISO, P.; SCHLITT, H.J.; DAHLKE, M.H. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. **Transplant Proc**, v. 41, p. 2607-2611, 2009.

ROSA SB, VOLTARELLI JC, CHIES JA, PRANKE P. The use of stem cells for the treatment of autoimmune diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 1579-1597, 2007.

SATO, Y.; ARAKI, H.; KATO, J.; NAKAMURA, K.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; SATO, T.; MIYANISHI, K.; TAKAYAMA, T.; TAKAHASHI, M. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood** v. 106, p. 756-763, 2005.

SCUTERI, A.; MILOSO, M.; FOUDAH, D.; ORCIANI, M.; CAVALETTI, G.; TREDICI, G. Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair? **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 82-92, 2011.

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 $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. **Cell Res**, v. 18, p. 846-857, 2008.

SLACK, J. M. Stem cells in epithelial tissues. **Science**, v. 287, p. 1431-1433, 2000.

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, p. e10088, 2010.

WEISSMAN, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Science**, v. 287, p. 1442-1446, 2000.