

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERESA RAQUEL TAVARES SEREJO

**INFLUÊNCIA DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 3 E DE INF- γ
SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

BRASÍLIA

2018

TERESA RAQUEL TAVARES SEREJO

**INFLUÊNCIA DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 3 E DE INF- γ
SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Brasília

2018

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

Ficha catalográfica

Serejo, Teresa Raquel Tavares

INFLUÊNCIA DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 3 E DE INF- γ SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. Teresa Raquel Tavares Serejo; orientador Felipe Saldanha de Araújo. Brasília, 2018. 59 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, 2018.

1. Célula-tronco mesenquimal. 2. Imunossupressão. 3. Sobrenadante. 4. Microvesículas. I. Saldanha de Araújo, Felipe, orient. II. Título.

TERESA RAQUEL TAVARES SEREJO

**INFLUÊNCIA DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 3 E DE INF- γ
SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira - Universidade Católica de Brasília

Dra. Isis Maria Quezado Soares Magalhães - Hospital da criança de Brasília José Alencar

“ O Senhor é meu pastor e nada me faltará”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por conduzir meus passos com fé e sabedoria em todos os momentos.

Aos meus pais: à minha mãe, por ser meu porto seguro e meu referencial. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis, por nunca me desamparar e sempre resolver tudo com tanto amor, agradeço por acreditar em mim, por sempre deixar claro o orgulho que sente dos teus filhos, sem dúvidas és o meu maior exemplo de amor. Ao meu pai, um homem nobre que não mediu esforços para educar os filhos, agradeço pelos ensinamentos, pelos conselhos e pelo incentivo de sempre. Vocês são os pilares da minha vida.

Aos meus irmãos, pela infância maravilhosa que tivemos, pela nossa união e pela nossa amizade. Sinto saudade de cada momento vivido ao lado de vocês. Sou imensamente agradecida por tê-los em minha vida.

À minha avó, agradeço pelo amor incondicional, pelas palavras de conforto e pelas orações. Obrigada por fazer parte da minha vida e por ser tão presente em todos os momentos. A você dedico todas as minhas conquistas.

Ao meu esposo Pedro, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou nas horas mais críticas, com força, amor, companheirismo e paciência. Sem seu amor e compreensão esse trabalho não teria sido alcançado. Agradeço por ter me presenteado com nosso filho Lucas, que é minha vida e minha fonte de energia

Aos amigos do laboratório HFAB, em especial: Ruza, Ângela, Celina, Samantha e Renata, obrigada pelo convívio, compreensão, amizade e por tornarem as minhas manhãs de trabalho mais agradáveis. Também não posso deixar de agradecer aos meus chefes, Major Killarney e Major Jaína, pelos conselhos e pelo apoio em momentos cruciais dessa jornada.

Às amigas do CLA: Lorena, por ser minha amiga do coração, mais que especial. Erika, obrigada por ser minha companheira de comida japonesa e companheira nas missas também. Fabíola, obrigada pelas conversas, desabafos e principalmente por ser meu ombro amigo favorito. Agradeço também à Mary e Vall, por mais de 14 anos de amizade, amo vocês.

Às companheiras de bancada Amandda e Luma, por permitirem que essa etapa fosse a mais divertida possível. Amandda, agradeço especialmente a você pelo apoio, risadas e lágrimas juntas.

Ao Laboratório de Farmacologia Molecular, meu muito obrigado ao Prof. Francisco e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído.

À Universidade Católica de Brasília, especialmente à Profa. Juliana Lott.

Ao Labiogene e ao Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da UnB pela possibilidade de uso do Citômetro de Fluxo e do Microscópio de Transmissão Eletrônica.

Finalmente agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo, a confiança depositada em mim na condução deste trabalho. Muito obrigada pela compreensão e por conduzir esse estudo com sua participação ativa. Agradeço imensamente a oportunidade e os seus ensinamentos que enriqueceram meu conhecimento científico.

RESUMO

SEREJO, Teresa Raquel Tavares. INFLUÊNCIA DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 3 E DE INF- γ SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. Brasília, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) desempenham importante função imunorregulatória, o que as tornam promissoras para o tratamento de situações em que o sistema imunológico apresenta-se com resposta exacerbada. Entretanto, os estudos *in vivo* em que se utilizam CTMs para controlar a resposta imune revelam resultados heterogêneos, impedindo uma conclusão clara e definitiva quanto ao uso clínico dessas células. Foi demonstrado em modelo murino que o INF- γ é capaz de ativar as CTMs realçando a sua capacidade de suprimir a resposta imunológica. Alguns estudos mostram que as propriedades das CTMs parecem ser influenciadas por receptores do tipo toll (RTT), especialmente RTT 3, que pode polarizar essas células para um estado anti-inflamatório. Outro ponto que tem recebido atenção da comunidade científica é o risco de efeito adverso proveniente da infusão das CTMs. Diante do exposto, esse estudo teve por objetivo investigar através de um modelo livre de células, se INF- γ e a sinalização de RTT 3, por uso de Poly (I:C), são capazes de realçar o potencial supressivo de CTMs de lipoaspirado. Para isso, inicialmente, testamos o efeito de INF- γ e Poly (I:C) na capacidade imunossupressiva das CTMs, através de um cocultivo dessas células com células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Em seguida, foi investigado o efeito desses tratamentos sobre a proliferação, potencial migratório e expressão gênica das CTMs. Utilizando um modelo livre de células, investigamos o potencial imunossupressivo do sobrenadante e das microvesículas obtidas de CTMs sobre CMSP. O tratamento dessas células com INF- γ realçou o seu potencial imunossupressivo, o que foi acompanhado por aumento na expressão de IDO e da molécula de adesão ICAM – dois fatores imunorregulatórios. Entretanto, no modelo livre de células, em que utilizamos sobrenadante total ou microvesículas celulares, os produtos obtidos de CTMs tratadas com INF- γ e Poly (I:C) não exerceram maior imunossupressão sobre os linfócitos T, quando comparados aos produtos provenientes das CTMs não tratadas. De modo geral, os resultados obtidos nesse estudo podem nortear caminhos para as novas estratégias terapêuticas livre de células, em que

os efeitos benéficos das CTMs são preservados e os riscos oriundos da administração dessas células evitados. Além disso, os nossos resultados também podem servir de base para abordagens que tenham como objetivo realçar as propriedades fundamentais das CTMs, como a propriedade imunorregulatória.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal, imunossupressão, sobrenadante e microvesículas.

ABSTRACT

SEREJO, Teresa Raquel Tavares. INFLUENCE OF TOLL-LIKE RECEPTOR-3 AND INF- γ SIGNALING ON THE IMMUNOSUPPRESSIVE POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS. Brasília, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Mesenchymal stem cells (MSCs) have important immunoregulatory roles, which makes them promising for the treatment of conditions in which the immune response is exacerbated. However, in vivo studies that use MSCs to control the immune response reveal heterogeneous results, and compromise any clear and definitive conclusion regarding the clinical use of these cells. In murine models, it has been demonstrated that INF- γ is able to promote MSCs activation and enhance their ability to suppress the immune response. Some studies show that MSC's properties appear to be influenced by toll-like receptors (TLRs), especially TLR3, which can polarize these cells towards an anti-inflammatory state. Another point that has received attention from the scientific community is the adverse effect risk coming from the infusion of MSCs. In this context, the aim of this study was to investigate whether INF- γ and TLR3 signaling by Poly (I:C) are capable of enhancing the immunosuppressive potential of MSCs and their secretome. We initially tested the effects of INF- γ and Poly (I:C) treatments over the immunosuppressive capacity of MSCs in a coculture system of these cells with peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Then, the effect of INF- γ and Poly (I:C) treatments over the proliferation, migration and transcriptional profile of MSCs was investigated. We also investigated the suppressive potential of the MSC-conditioned media and MSC-derived microvesicles over PBMC. Our data indicates that the treatment of MSCs with INF- γ enhanced their immunosuppressive potential, supported by the increased expression of IDO and the adhesion molecule ICAM - two immunoregulatory factors. However, the conditioned media obtained from INF- γ and Poly (I:C) treated MSCs did not exert greater immunosuppression over T lymphocytes, when compared to the supernatant of untreated MSCs. In general, the results obtained in this study may pave the way to new cell-free therapeutic strategies, in which the beneficial effects of MSCs are preserved, and the risks from the administration of these cells are avoided. In addition, our results may also serve

as a basis for novel approaches that aim to highlight the fundamental properties of MSCs, such as their immunoregulatory property.

Key words: Mesenchymal stem cell, immunosuppression, supernatant and microvesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos da imunomodulação das CTMs.	19
Figura 2. Microvesículas derivadas de CTMs.	24
Figura 3. Fenotipagem das CTMs	35
Figura 4. Análise da Viabilidade/Proliferação celular	36
Figura 5. Migração das CTMs.....	38
Figura 6. Cocultivo de CMSP com CTMs	39
Figura 7. Proliferação de linfócitos cultivados com sobrenadante de CTMs licenciadas e não licenciadas	39
Figura 8. Expressão de ICAM e VCAM	40
Figura 9. Expressão de receptores RTT3 e RTT4	41
Figura 10. Expressão gênica das CTMs	43
Figura 11. Caracterização física e fenotípica das microvesículas	44
Figura 12. Efeito das microvesículas obtidas de CTMs sobre proliferação de linfócitos	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg = micrograma

μL = microlitro

μM = micromolar

CMSP = Células Mononucleares do Sangue Periférico

CTMs = Células-tronco Mesenquimais

DECH = Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

DMSO = Dimetilsulfóxido

FITC = do inglês "*Fluorescein isothiocyanate*"

HGF = do inglês "*Hepatocyte Growth Factor*"

HLA = do inglês "*Human Leukocyte Antigen*"

ICAM = do inglês "*Intracellular adhesion molecule*"

IDO = Indoleamina 2,3-dioxigenase

INF- γ = Interferon gamma

IL = Interleucina

MHC = do inglês "*Major Histocompatibility Complex*"

MTT = brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolim]

NK = do inglês "*Natural Killer*"

PBS = do inglês "*Phosphate Buffered Saline*"

PCR = do inglês "*Polymerase Chain Reaction*"

PGE2 = Prostaglandina E2

Poly (I:C) = ácido policitidílico

RNA = do inglês “*Ribonucleic Acid*”

RTT = Receptor do tipo Toll

rpm = rotações por minuto

SBF = Soro Bovino Fetal

TGF- β : Do inglês “*Transforming Growth Factor beta*”

TNF = do inglês “*Tumor Necrosis Factor*”

VCAM = do inglês “*Vascular Adhesion molecule*”

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Células-Tronco Mesenquimais	17
1.2. Licenciamento de CTMs	20
1.3. Riscos associados à infusão de CTMs	22
1.4. Estratégias terapêuticas livres de células.....	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivos Gerais	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Obtenção das Amostras	27
3.2. Cultivo das células-tronco mesenquimais (CTMs)	27
3.3. Caracterização imunofenotípica das CTMs.....	27
3.4. Ensaio de viabilidade/proliferação das CTMs por MTT	28
3.5. Ensaio de migração das CTMs pela técnica de “ <i>wound scratch assay</i> ”	28
3.6. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	29
3.7. Ensaio de imunossupressão de CMSP por CTMs licenciadas	29
3.8. Ensaio de imunossupressão dos sobrenadantes de CTMs licenciadas sobre CMSP por CFSE	30
3.9. Expressão de moléculas de adesão VCAM e ICAM em CTMs.....	31
3.10. Expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs por Citometria de Fluxo	31
3.11. PCR em Tempo Real	32

3.12. Isolamento e caracterização das microvesículas	32
3.13. Validação das microvesículas por Citometria de Fluxo	33
3.14. Avaliação da capacidade supressiva das microvesículas	33
3.15. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Perfil fenotípico das CTMs	35
4.2. Poly (I:C) e INF- γ não induzem proliferação de CTMs	36
4.3. Poly (I:C) e INF- γ não estimulam a migração das CTMs	36
4.4. INF- γ potencializa o poder imunossupressivo das CTMs	38
4.5. Sobrenadantes de CTMs licenciadas não apresentam vantagem imunossupressiva	39
4.6. INF- γ isolado ou em combinação com Poly (I:C) aumenta a expressão de ICAM em CTMs	40
4.7. Expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs	41
4.8. Perfil de expressão gênica das CTMs	41
4.9. Isolamento e caracterização das microvesículas	43
4.10. Efeito imunossupressivo das microvesículas	45
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	51
7. PERSPECTIVAS	52
8. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs), foram identificadas no fim da década de 60 por Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Essas células apresentam morfologia fibroblastóide e são capazes de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos (PITTENGER et al., 1999). Embora as CTMs tenham sido inicialmente identificadas na medula óssea, atualmente sabe-se que essas células podem ser obtidas de praticamente todos os tecidos (COVAS et al., 2008).

Devido à falta de um marcador específico para identificação das CTMs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu que a identificação dessas células deve ocorrer por: aderência ao plástico, caracterização imunofenotípica e capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos. A caracterização imunofenotípica é baseada na ausência de marcadores hematopoiéticos (CD11, CD14, CD34 e CD45) e moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86), e pela presença dos marcadores CD105, CD73 e CD90 (DOMINICI et al., 2006).

A ampla distribuição das CTMs forneceu indícios de que possivelmente exerciam diferentes funções biológicas no organismo. De fato, além de suportar a hematopoese, dentre outras funções, essas células também possuem propriedades antiapoptóticas, atuam na angiogênese e na regulação da resposta imune (MEIRELLES et al., 2009).

Uma das propriedades mais intrigantes das CTMs é a sua capacidade de regulação do sistema imunológico (figura 1). Diversos estudos têm demonstrado que essas células são pouco imunogênicas e modulam o sistema imune agindo diretamente sobre as células T (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; BARTHOLOMEW et al., 2002; KRAMPERA et al., 2003; KRAMPERA et al., 2006; SATO et al., 2007).

De maneira geral, os estudos *in vitro* demonstram que o efeito supressivo das CTMs sobre os linfócitos T ocorre basicamente por três principais mecanismos: adesão célula-célula, liberação de fatores solúveis e indução de linfócitos regulatórios (Tregs). Em meio inflamatório, as CTMs exibem aumento da expressão de moléculas de adesão e passam a recrutar mais linfócitos através do contato célula-célula (GAJEWSKI et al., 2006).

A capacidade das CTMs em regular o sistema imunológico *in vitro* é relativamente bem conhecida. Embora alguns estudos sugiram que o contato célula-célula seja essencial, a maioria corrobora sobre a importância dos fatores solúveis nos mecanismos de supressão dessas células (NAUTA; FIBBE et al, 2007). Foi demonstrado o envolvimento dos fatores solúveis nos mecanismos de imunossupressão das CTMs através de experimentos com uso de membranas semipermeáveis, (trans-well) que permitem a passagem de fatores solúveis e impedem o contato célula-célula (NICOLA et al, 2002). Diversos fatores participativos dos mecanismos pelos quais as CTMs imunomodulam os linfócitos já foram descritos, como adenosina (SALDANHA-ARAÚJO et al., 2011), HGF (NICOLA et al., 2002), TGF- β (NICOLA et al., 2002), IDO (MEISEL et al., 2004), PGE2 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005) e NO (SATO et al., 2007).

Além do contato célula-célula e da liberação de fatores solúveis, evidências experimentais demonstraram que as CTMs exercem o seu efeito supressivo através da indução de Tregs (MACCARIO et al., 2005; PREVOSTO et al., 2007). Esses linfócitos constituem uma classe de células que apresentam CD25 em sua superfície, além da presença de níveis elevados do fator de transcrição Foxp3. Eles possuem ainda capacidade de suprimir a resposta de outras células do sistema imune. Além disso, essa população de células T com atividade reguladora pode contribuir para a prevenção da rejeição de transplantes e da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (WOOD; BUSHELL; HESTER, 2012). Além de induzir os Tregs clássicos CD4CD25FOXP3, as CTMs parecem ser capazes de promover a geração de Tregs não clássicos (SALDANHA-ARAÚJO, 2012).

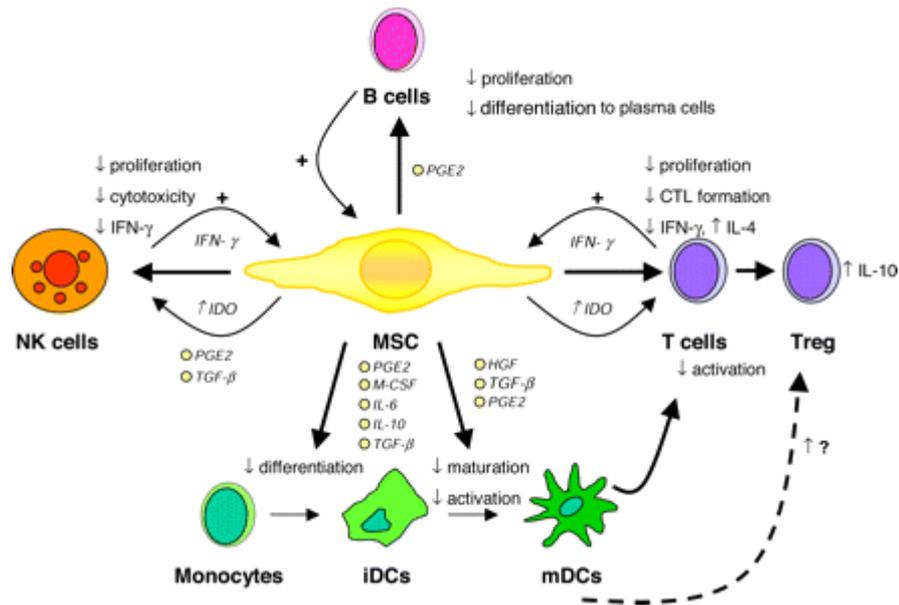


Figura 1: Efeitos da imunomodulação das CTMs. Ilustração acerca dos mecanismos de imunomodulação das CTMs (obtido de NAUTA; FIBBE, 2007).

As propriedades imunomoduladoras observadas *in vitro* geraram um grande interesse na comunidade científica, principalmente na aplicação clínica dessas células para tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro, DECH (LE BLANC et al., 2004; RINGDEN; LE BLANC, 2011). Essa doença foi primeiramente relatada por Barnes e os requisitos para desenvolvimento dela foram estabelecidos por Billingham, sendo eles: incapacidade do receptor em montar uma resposta efetiva para eliminar as células transplantadas; presença de células imunologicamente competentes no enxerto; e expressão no receptor de antígenos que não estão presentes no doador (BARNES; LOUTIT; MICKLEM, 1962; BILLINGHAM, 1966). Portanto, a DECH consiste em uma síndrome em que as células imunocompetentes do doador reconhecem e atacam os tecidos do hospedeiro (BARNES; LOUTIT; MICKLEM, 1962).

A ausência de dados pré-clínicos sólidos, não estagnou a utilização clínica de CTMs no tratamento da DECH. A aplicação dessas células evoluiu substancialmente, sobretudo a partir dos estudos de Le Blanc e colaboradores, em que demonstraram o potente papel imunossupressor *in vivo* das CTMs após realizarem infusão intravenosa dessas células em paciente com doença do enxerto contra o hospedeiro aguda, resultando em significativa melhora clínica (LE BLANC et al., 2004).

Estudos posteriores mostraram que a infusão dessas células em pacientes que não respondem ao tratamento convencional da DECH pode ser uma terapia promissora. Foi relatada melhora no quadro clínico de 45% de pacientes com DECH aguda que não responderam a terapia com corticoides (VON BONIN et al., 2009). Além disso, um estudo adicional mostrou que aproximadamente metade dos pacientes com DECH aguda corticoide resistente responderam a infusão de CTM, sendo que essa estratégia terapêutica foi ainda capaz de reverter a toxicidade dos tecidos (RINGDEN; LE BLANC, 2011).

Além da capacidade de regular o sistema imunológico, sabe-se que essas células também possuem a importante propriedade de migração, que é ponto chave para que consigam desempenhar suas funções biológicas no local de enxertia. Já foi demonstrado que as CTMs são recrutadas para locais de inflamação para cumprir sua função de reparo (TOMCHUCK et al., 2008). Ainda, são importantes para promover o enxerto de células tronco hematopoiéticas (LEE et al., 2013; LIU et al., 2011), que é uma grande preocupação, especialmente quando se realiza o transplante com sangue de cordão umbilical (DE LIMA et al., 2012).

Apesar do uso clínico dessas células apresentarem resultados promissores para tratamento da DECH, existem algumas limitações a serem contornadas, sendo as principais o elevado número de células para se alcançar o efeito terapêutico desejado e a resposta clínica heterogênea. Para contornar essas limitações, tem-se buscado estratégias de licenciamento que realcem a capacidade supressiva das CTMs.

1.2 Licenciamento de CTMs

A ativação das CTMs, também chamada de licenciamento, pode ocorrer pela presença de citocinas inflamatórias como INF- γ e TNF- α que parecem ser capazes de aumentar a capacidade supressora dessas células (ENGLISH et al., 2007; RYAN et al., 2007). Foi demonstrado em um modelo murino, que a eficácia terapêutica das CTMs no tratamento da DECH é dependente dos níveis de INF- γ , e que o pré-tratamento das CTMs com essa citocina inflamatória, aumenta seu potencial supressivo e exige um menor número de células para alcançar o benefício terapêutico esperado (POLCHERT et al, 2008).

O licenciamento de CTMs com INF- γ parece ser promissor, haja vista que esse licenciador está relacionado com a produção deIDO (KRAMPERA et al., 2006), uma enzima imunossupressora que atua no catabolismo do triptofano e, conseqüentemente, na supressão

de linfócitos T (MEISEL et al., 2004). Parece que os efeitos benéficos das CTMs sobre a DECH ocorrem devido à ativação das suas propriedades imunomoduladoras pelo IFN- γ produzido pelas células T (KRAMPERA et al., 2006).

Foi demonstrado ainda que CTMs murinas quando em presença de IFN- γ e TNF- α , passam a apresentar maior capacidade de suprimir a resposta de linfócitos T (SZABO et al., 2015). Além disso, foi proposto que a função imunossupressiva das CTMs é induzida pelo IFN- γ na presença concomitante de qualquer outra citocina pró-inflamatória, como por exemplo: TNF- α , IL-1a ou IL-1b (REN et al., 2008).

Assim como ocorre com IFN- γ , a sinalização de RTT também é capaz de realçar o potencial supressivo das CTMs. A expressão de RTT em CTMs tem sido estudada a nível de RNA e proteínas, por uso de PCR e citometria de fluxo. Existem resultados consistentes mostrando a expressão de RNA para RTT 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em CTMs advindas de medula óssea e tecido adiposo, tanto em humanos como em modelo murino. Por outro lado, os resultados são inconsistentes quanto a expressão de RTT 7, 8, 9 e 10. A nível proteico está descrito que CTMs expressam os RTT 2, 3, 4, 7 e 9 (DELAROSA; LOMBARDO, 2010). Embora alguns trabalhos sejam controversos quanto ao efeito da sinalização de RTT sobre a propriedade imunossupressiva das CTMs (CHEN et al., 2014 ; LIOTTA et al., 2008), grande parte mostra que o estímulo de RTT3 com agonista específico polariza as CTMs para um estado anti-inflamatório e induz maior potencial imunorregulador nessas células (ZHAO et al., 2014; CHEN et al., 2013; TOMIC et al., 2011; OPITZ et al., 2009).

A presença dos receptores RTT em CTMs resulta em implicações importantes no que diz respeito ao tratamento da DECH, uma vez que os resultados obtidos até o momento são heterogêneos e não são todos os pacientes que se beneficiam por uso dessa medida terapêutica. Uma meta-análise a partir dos dados encontrados na literatura, mostra que crianças com DECH tendem a responder melhor ao tratamento com CTMs que adultos (resposta completa 57,4% vs 45,1%), mas que existe um número considerável de pacientes que não apresentam resposta ao tratamento (18% crianças vs 30,3% adultos) (WERNICKE et al., 2011). Em parte, esses resultados heterogêneos podem ser decorrentes do estado de inflamação do paciente e estágio da doença. Ademais, produtos de microrganismos circulantes podem influenciar na polarização das CTMs administradas a esses pacientes. Foi demonstrado que em diversas doenças inflamatórias ocorre ativação de RTT (YAMAMOTO-FURUSHO; PODOLSKY, 2007). Deste modo, quando utilizadas clinicamente para

tratamento de doenças inflamatórias, as CTMs podem ser expostas a ligantes desses receptores, o que reforça a importância de se investigar o efeito da sinalização desses receptores nas CTMs em diferentes circunstâncias.

Cada vez mais tem se buscado por estratégias de licenciamento das CTMs para realçar o seu potencial supressivo. Entretanto, ainda que se busque por estratégias capazes de otimizar as funções dessas células, um outro ponto que tem atraído a atenção especial da comunidade científica diz respeito aos riscos inerentes a infusão de células.

1.3. Riscos associados à infusão de CTMs

De modo geral, as CTMs tem se mostrado uma ferramenta terapêutica promissora para o tratamento de DECH. Pacientes com essa patologia normalmente são submetidos a severos regimes imunossupressores. Foi demonstrado, que múltiplas infusões de CTMs podem gerar melhoras clínicas em pacientes diagnosticados com DECH aguda e crônica, além de reduzir a necessidade de linhas adicionais de tratamento (DANDER et al., 2012).

Devido às propriedades imunológicas das CTMs foi desenvolvido o primeiro medicamento à base dessas células - PROCHYMAL – destinado exclusivamente para o tratamento da DECH (Osiris Therapeutics). Entretanto, já foram descritas complicações decorrentes de sua administração. De fato, ainda que pese o potencial clínico das CTMs, existem também riscos potenciais e imprevistos. A avaliação desses riscos deve ser um pré-requisito antes de terapias com infusão de células. Uma alternativa importante seria o desenvolvimento de estratégias em que o potencial das CTMs seja explorado, sem que se corram os riscos da infusão celular (BREITBACH et al., 2017; HERBERTS et al., 2011; LAI; CHEN; LIM, 2011).

A infusão de CTMs gera o receio de um possível potencial de formação de tumores, principalmente pelas características das células-tronco se assemelharem as de células cancerosas. Receptores como CXCR 2 e 4 são encontrados em células cancerosas e células-tronco, e influenciam a localização, ou invasão / metástases de células cancerosas, sugerindo uma ligação entre as duas populações celulares (LI et al., 2006).

Outro aspecto importante, que suscita atenção, é que os trabalhos têm demonstrado a necessidade de elevado número de CTMs para que elas exerçam seus efeitos clínicos. Essa massa de células pode favorecer a formação de agregados celulares que são potenciais

causadores de embolia pulmonar ou infartos após infusão (PROCKOP; OLSON, 2007). Normalmente não se sabe a quantidade de células que deve ser administrada, entretanto, devido à taxa de retenção e a possível baixa resistência celular, torna-se necessária administração de grandes quantidades de CTMs (LAMOURY et al., 2011).

Os riscos inerentes a infusão das CTMs leva a comunidade científica a questionar se não seria vantajoso o desenvolvimento de estratégias que visem usar os produtos produzidos por elas, haja vista o amplo arsenal de moléculas bioativas produzidas por essas células (CAPLAN; DENNIS, 2006).

Portanto, torna-se emergente o desenvolvimento de abordagens alternativas em que se garanta os efeitos das células, sem que elas sejam utilizadas. Ainda, seria extremamente relevante associar a essa busca a inclusão de modelos de licenciamento, com vistas a se conseguir um efeito imunorregulatório mais potente.

1.4. Estratégias terapêuticas livres de células

As CTMs produzem abundantes fatores de crescimento e citocinas, muitas das quais, modulam o sistema imunológico e estão presentes nos sobrenadantes dessas células. Já foi descrito que o meio condicionado pelas CTMs produz efeitos terapêuticos semelhantes aos das células, em modelo *in vitro* de lesão epitelial alveolar (GOOLAERTS et al., 2014). Adicionalmente, foi relatado que o meio condicionado por CTMs melhorou a função cardíaca após infarto do miocárdio (TIMMERS et al., 2011).

Sabe-se que em organismos pluricelulares, a comunicação celular ocorre por intermédio de moléculas extracelulares, como nucleotídeos, lipídeos e proteínas. Essas moléculas, depois de liberadas, são capazes de se ligar a receptores e induzir a sinalização e a modificação do estado fisiológico das células alvo. É interessante, pois células eucarióticas liberam no microambiente extracelular vesículas membranosas que carregam proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BOBRIE et al., 2011).

Com base na biogênese, as vesículas extracelulares podem ser classificadas em: microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos. As microvesículas são geradas a partir de brotação da membrana plasmática, enquanto os exossomos são derivados do compartimento endossomal. Ambos contêm mRNA, microRNA e proteínas de membrana. Os exossomos, por sua vez, apresentam o tamanho aproximado de 40–120nm, enquanto as microvesículas apresentam 50–1,000nm (ANDALOUSSI et al., 2013).

As moléculas bioativas secretadas pelas CTMs podem atuar como mediadores parácrinos ou endócrinos, afetando diretamente as células alvo e/ou induzindo essas células a secretarem outros agentes bioativos (CAPLAN; DENNIS, 2006). Já foi demonstrado que as CTMs secretam uma grande quantidade de microvesículas que podem induzir diferentes efeitos dependendo da célula alvo (figura 2) (YÁÑEZ-MO et al., 2015). Em parte, esses efeitos poderiam ser oriundos de mRNA e microRNAs (COLLINO et al., 2010; BRUNO et al., 2009).

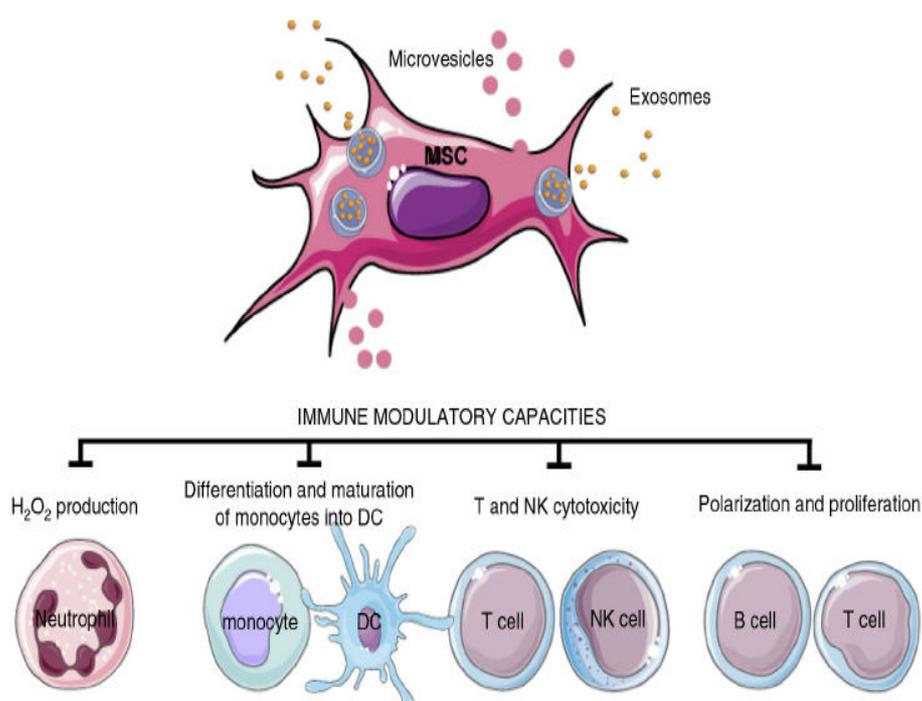


Figura 2: Microvesículas derivadas de CTMs. As microvesículas derivadas das CTMs podem exercer diferentes efeitos dependendo da célula-alvo (obtido de YÁÑEZ-MO et al., 2015).

Evidências científicas indicam que essas vesículas extracelulares, através dos seus efeitos parácrinos podem desempenhar papel chave na terapia baseada em CTMs (ANDALOUSSI et al., 2013). De fato, esses produtos celulares apresentam-se como atraentes alternativas para diversas terapias, em especial, no campo da imunomodulação. Em estudo realizado em modelo murino, as vesículas extracelulares provenientes de CTMs de cordão umbilical foram capazes de atenuar as manifestações *in vivo* da DECH aguda, além de

promoveram a sobrevivência de camundongos que sofreram transplantes de células-tronco hematopoéticas (WANG, L. et al., 2016). Além disso, já foi demonstrado que as microvesículas liberadas pelas CTMs possuem efeito regenerativo, em que controlam a apoptose e a injúria tissular (BRUNO et al., 2009), previnem o desenvolvimento de doença renal crônica (GATTI et al., 2011) e promovem função cardioprotetora (LAI; CHEN; LIM, 2011).

Como pode ser visto, o uso dos produtos das CTMs passou a receber atenção da comunidade científica recentemente, sendo assim, as informações referentes à aplicação dessa estratégia no campo da reposta imune, envolvendo células humanas, é extremamente escassa.

OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o efeito de INF- γ e de Poly (I:C) sobre o potencial imunossupressivo das CTMs.

Específicos:

- Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as CTMs;
- Avaliar a influência do INF- γ e de Poly (I:C) na migração das CTMs;
- Determinar a influência do INF- γ e de Poly (I:C) na proliferação das CTMs;
- Investigar o efeito supressivo das CTMs previamente licenciadas com INF- γ , Poly (I:C) e INF- γ + Poly (I:C) sobre a proliferação dos linfócitos;
- Comparar o potencial supressivo do sobrenadante de CTMs não ativadas com CTMs ativadas com Poly (I:C), com INF- γ e com Poly (I:C) + INF- γ ;
- Avaliar o perfil de expressão gênica das CTMs tratadas com Poly (I:C), INF- γ e com Poly (I:C) + INF- γ ;
- Isolar microvesículas liberadas no sobrenadante de CTMs; e
- Avaliar se a proliferação dos linfócitos T pode ser exclusivamente modulada por microvesículas liberadas pelas CTMs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das Amostras

Nesse projeto foram utilizadas 2 amostras de CTMs de tecido adiposo, fornecidas pela empresa Cellseq solutions (www.cellseqsolutions.com). As amostras de CMSP foram obtidas de doadores saudáveis. O uso científico das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CAAE: 35640514.5.3001.5440). Para todos os experimentos foram utilizadas CTMs entre 4-6 passagem.

3.2. Cultivo das células-tronco mesenquimais (CTMs)

As CTMs foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75cm² (Falcon; Franklin Lakes, NJ) em meio alfa-mínimo essencial (alpha-MEM, Minimum Essential Medium) suplementado com 100 µg/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina, 2mM Lglutamina e 15% de soro bovino fetal até atingirem a confluência de 70%, seguindo protocolo estabelecido na literatura. Após o período de expansão, as células foram colhidas por tripsinização utilizando uma solução 0,2% tripsina-EDTA e utilizadas nos experimentos propostos.

3.3. Caracterização imunofenotípica das CTMs

Para cumprimento dos critérios de classificação das CTMs, estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, as células utilizadas nesse estudo foram caracterizadas imunofenotipicamente por Citometria de Fluxo, pela utilização do *Kit Human MSC Analysis* (BD Biosciences), seguindo as orientações do fabricante. Em suma, as células foram cultivadas em meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF e submetidas ou não ao tratamento por 48 horas com Poly (I:C) (1µg/mL), INF-γ (50ng/mL) e Poly (I:C) (1µg/mL) + INF-γ (50ng/mL).

Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas, sendo 1 x 10⁵ CTMs separadas para fenotipagem com os marcadores positivos (CD90, CD105, CD73 e CD44) e negativos (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR). O experimento foi analisado em Citômetro de Fluxo FACSverse no Instituto de Biologia-UnB.

3.4. Ensaio de viabilidade/proliferação das CTMs por MTT

A proliferação das CTMs foi avaliada por ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolim]}. Nesse experimento avaliamos o efeito simultâneo e isolado do Poly (I:C) e do INF- γ como licenciadores das CTMs.

Para isso, foram plaqueadas 2×10^3 CTMs em placa de 96 poços contendo 100 μ l de meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF. As CTMs foram licenciadas por 48h com Poly (I:C) (1 μ g/mL), INF- γ (50 ng/mL) e Poly (I:C) (1 μ g/mL) + INF- γ (50 ng/mL). Após 48 horas dos tratamentos, o meio de cultivo foi retirado da placa, os poços lavados com tampão PBS e novo meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF foi adicionado ao cultivo celular. A placa foi mantida em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C, sendo a viabilidade/proliferação analisada nos dias 2, 5 e 7 do cultivo.

Nos dias de leitura das placas, foi adicionado aos 100 μ l de meio, 10 μ l de MTT em cada poço, sendo as placas envolvidas em papel alumínio e mantidas em estufa incubadora com atmosfera de 5% CO₂ a 37° C por 4 h. Após esse período o meio foi removido, 100 μ l de DMSO foram adicionados e a placa foi colocada em bandeja agitadora por 15 minutos. Findado esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância em 570nm na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter).

3.5. Ensaio de migração das CTMs pela técnica de “*wound scratch assay*”

Para avaliar o potencial de migração, as CTMs foram plaqueadas em placa de 6 poços, contendo 1,5 mL de meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF. Esse ensaio envolveu os grupos CTMs (controle), CTMs licenciadas com: Poly (I:C) (1 μ g/mL), INF- γ (50 ng/mL) e Poly (I:C) (1 μ g/mL) + INF- γ (50 ng/mL).

Após o plaqueamento das CTMs, os grupos receberam por 48h os tratamentos supracitados. Findado o período de tratamento, os meios foram removidos da placa e as células lavadas por três vezes com tampão PBS para que os tratamentos fossem completamente removidos. Nesse momento foi realizado um risco no fundo de cada poço com uso de uma ponteira p200 que serviu como área de análise para migração das CTMs (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Após confecção dos riscos, os poços foram novamente lavados para retirar eventuais restos celulares e foi adicionado meio de cultivo alfa-mínimo essencial sem suplementação

com SBF. O cultivo celular foi acompanhado em uma mesma região determinada de cada risco e foi fotografado nos tempos 0, 12h e 24h. A área livre de células foi mensurada nos diferentes tempos por uso do *software ImageJ (National Institutes of Health)*.

3.6. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

As CMSP foram isoladas por uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), a partir de amostras de sangue periférico coletadas de doadores saudáveis em tubos contendo anticoagulante EDTA.

Tubos cônicos de 15 mL foram preenchidos com 3 ml de Ficoll, 4 mL de sangue total e 4 mL de tampão PBS, sendo que todos os reagentes estavam em temperatura ambiente. Os tubos cônicos foram centrifugados a 360g por 25 minutos. Após esse tempo, o halo de células mononucleares foi coletado com auxílio de uma pipeta *pasteur*, transferido para um tubo cônico de 50 mL e lavado três vezes com PBS. Em seguida, o pellet celular foi ressuscitado em 1 mL de PBS a 10% SBF para marcação com corante *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE, Sigma Aldrich).

Para a marcação utilizamos concentração de 2,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de CFSE, sendo as células incubadas por 7,5 minutos a 37° C, em banho-maria. Após esse período a marcação foi interrompida com RPMI gelado contendo 10% de SBF, mantendo-se a amostra refrigerada por 5 minutos. Posteriormente foram realizadas lavagens com tampão PBS, utilizando centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos.

Por fim, o pellet celular obtido das lavagens foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SBF, e essas células foram utilizadas para o ensaio de imunossupressão.

3.7. Ensaio de imunossupressão de CMSP por CTMs licenciadas

Para analisar o efeito isolado e simultâneo de Poly (I:C) e INF- γ sobre o licenciamento das CTMs, foi avaliada a capacidade dessas células em suprimir a proliferação dos linfócitos T, quando previamente tratadas por 48 horas com Poly (I:C) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), INF- γ (50 ng/mL) e Poly (I:C) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + INF- γ (50 ng/mL).

Para isso, 3 x 10⁴ CTMs foram plaqueadas e licenciadas por 48 horas em placas de 96 poços contendo 200 μl de meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, os poços foram lavados 3 vezes com

tampão PBS e adicionado RMPI com 10% de SBF. Em seguida, adicionou-se 3×10^5 CMSP previamente marcadas com CFSE e ativadas com $5 \mu\text{g/mL}$ de fitohemaglutinina.

Ao quinto dia do experimento as CMSP foram recolhidas, transferidas para microtubos e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, sendo obtido o botão celular, que foi ressuspenso em PBS e incubado por 30 minutos com anti-CD3 APC (Thermo Fisher), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida as amostras foram centrifugadas e ressuspenso em 300 microlitros de PBS 4 % formaldeído. A proliferação celular foi analisada no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

3.8. Ensaio de imunossupressão dos sobrenadantes de CTMs licenciadas sobre CMSP por CFSE

A capacidade do sobrenadante de CTMs oriundas de tecido adiposo em suprimir a proliferação dos linfócitos foi avaliada através de ensaios de imunossupressão. Resumidamente, $1,5 \times 10^5$ CTMs foram plaqueadas em placas de 24 poços e licenciadas por 48 horas com Poly (I:C) ($1 \mu\text{g/mL}$), INF- γ (50 ng/ml) e Poly (I:C) ($1 \mu\text{g/ml}$) + INF- γ (50 ng/ml). Após 48 horas de licenciamento, o meio de cultivo alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF foi removido e os poços lavados 3 vezes com tampão PBS. As CTMs receberam meio RPMI suplementado com 10% de SBF que permaneceu em contato com todas as células por 24 horas.

O meio que esteve em contato com as CTMs por 24 horas foi coletado, centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos e utilizado para os ensaios de imunossupressão juntamente com 4×10^5 de CMSP previamente marcadas com CFSE e estimuladas com $5 \mu\text{g} /\text{mL}$ de fitohemaglutinina.

Ao quinto dia do experimento as CMSP foram recolhidas, transferidas para microtubos e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, sendo obtido o botão celular que foi ressuspenso em PBS e incubado por 30 minutos com anti-CD3 APC (Thermo Fisher), seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, a proliferação celular foi avaliada por Citometria de fluxo (Citômetro FACSVerse).

3.9. Expressão de moléculas de Adesão VCAM e ICAM em CTMs

A avaliação da influência de INF- γ e de Poly (I:C) na expressão de VCAM e ICAM em CTMs foi realizada por Citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos anti-CD106 (VCAM) e anti-CD54 (ICAM) conjugados a FITC e APC, respectivamente.

Para isso, $1,5 \times 10^5$ CTMs foram plaqueadas em placa de 24 poços e tratadas por 48 horas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de Poly (I:C), 50 ng/mL de INF- γ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de Poly (I:C) + 50 ng/mL de INF- γ . Após as 48 horas, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com tampão PBS e as células foram recolhidas e acondicionadas em microtubos devidamente identificados. As amostras foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos, posteriormente foram lavadas com tampão PBS e analisadas no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

Para validação do resultado obtido, investigamos adicionalmente a expressão de ICAM após tratamento com 25 ng, 50ng e 100ng/mL de INF- γ . As CTMs foram plaqueadas e receberam os tratamentos por 48 horas, findado esse tempo, as células foram recolhidas e marcadas por 30 minutos com anti-CD54. Posteriormente foram lavadas com tampão PBS e analisadas no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience).

3.10. Expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs por Citometria de Fluxo

A avaliação da influência do Poly (I:C) e INF- γ sobre a expressão dos RTT e 3 e 4 das CTMs foi realizada por Citometria de fluxo, através do uso dos anticorpos anti-RTT3 e anti-RTT4. Resumidamente 2×10^5 CTMs foram plaqueadas em placas de 24 poços, tratadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de Poly (I:C), 50 ng/mL de INF- γ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de Poly (I:C) + 50 ng/mL de INF- γ por 48 horas. Após este período, o meio com os tratamentos foi removido os poços foram lavados com tampão PBS, as CTMs foram recolhidas, acondicionadas em microtubos previamente identificados e submetidas a marcação com anticorpos anti-RTT3 e anti-RTT4 conjugados a PE (eBioscience).

Para marcação de RTT3 foi utilizado o kit *Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set* (eBioscience), conforme orientações do fabricante. As marcações ocorreram por incubação com os anticorpos por um período de 20 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com tampão PBS e analisadas no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

3.11. PCR em tempo real

O perfil de expressão de genes relacionados à resposta imune foi avaliado por PCR em tempo real. Para esse ensaio utilizamos CTMs não licenciadas e licenciadas por 48 horas com Poly (I:C) (1 µg/mL), INF-γ (50 ng/mL) e Poly (I:C) (1 µg/mL) + INF-γ (50 ng/mL). Após o período de licenciamento, as CTMs foram recolhidas por tripsinização, lavadas e ressuspendidas em PBS. Essas amostras foram submetidas a extração de RNA por uso do Kit de Extração *PureLink RNA Mini Kit* (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. Após obtenção do RNA, procedemos a análise da quantidade e qualidade desse material, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop da Universidade Católica de Brasília. Posteriormente, foi realizada a Síntese do cDNA, por uso do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante.

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada pela metodologia TaqMan (Thermo Fisher), cujos primers e sondas foram adquiridos pelo sistema *AssayOnDemand*. O gene calibrador utilizado foi o GAPD, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise pela metodologia DDCT (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Analisamos a expressão dos seguintes genes: IDO, TNF-α, IL-6, IL-1β, Galectina, TGF e IL-10 no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (ThermoFisher). No mesmo equipamento, analisamos pela metodologia de SYBR green a expressão do gene CXCR7. Os primers usados tiveram as seguintes sequencias: CXCR7 GTGGTGGTCTGGGTGAATATC e ATGTAGCAGTGCGTGTCATAG.

3.12. Isolamento e caracterização das microvesículas

O isolamento das microvesículas de CTMs ocorreu após cultivo dessas células em frascos de cultura celular de 75 cm² (Falcon; Franklin Lakes, NJ) em meio alfa-mínimo essencial (alpha-MEM, Minimum Essential Medium) suplementado com 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 2 mM L-glutamina.

Para a obtenção das microvesículas, utilizamos o kit total *exosome isolation* (ThermoFisher), conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, as microvesículas foram avaliadas quanto ao seu tamanho médio por uso do equipamento Zetasizer nano (Malvern) e submetidas à quantificação proteica pelo uso de Bradford. Por fim, as microvesículas foram concentradas em 1000 µl de PBS e reservadas para validação e ensaios funcionais.

Para obtenção das imagens das microvesículas foram utilizadas telas de microscopia eletrônica cobertas por uma fina película de Formvar. A amostra foi fixada com Karnovsky (Glutaraldeído 2%, Paraformaldeído 2%, 5M CaCl₂ e sacarose 3% em tampão Cacodilato de sódio 0.1 M) *overnight*. Cinco microlitros da amostra fixada foram depositados sobre o filme, seguido de contrastação utilizando ácido fosfotúngstico (PTA) e posteriormente foi realizada análise da morfologia utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL-1011 a 80kv no Instituto de Biologia-UnB.

3.13. Validação das microvesículas por Citometria de Fluxo

Para validação, as microvesículas foram incubadas com beads de látex 4 µm (Invitrogen) em 1mL de PBS, *overnight*. Posteriormente, foi adicionado solução de glicina 1M e realizada centrifugação a 4000 rpm por 3 minutos, o pellet obtido foi ressuscitado em 250µL de PBS suplementado com 0,5% de Albumina Bovina (BSA, Sigma Aldrich). As microvesículas conjugadas as beads foram incubadas com os anticorpos anti-CD90 FITC e anti-CD105 PerCP por 30 minutos a 4°C. Após incubação, foram realizadas lavagens com PBS utilizando centrifugação a 4000 rpm por 3 minutos. Finalmente, as microvesículas foram analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences).

3.14. Avaliação da capacidade supressiva das microvesículas

Em suma, foi testado o potencial imunossupressivo de diferentes concentrações de microvesículas (0,12 µg, 0,25 µg, 0,5 µg e 0,75µg) sobre os linfócitos T. O ensaio ocorreu em placa de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% SBF e foram adicionados aos poços 4×10^5 CMSP previamente marcadas com CFSE e estimuladas com 5 µg /mL de fitohemaglutinina.

Ao quinto dia do experimento as CMSP foram recolhidas, transferidas para microtubos e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, sendo obtido o botão celular que foi ressuscitado em PBS e incubado por 30 minutos com anti-CD3 APC (Thermo Fisher), seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, a proliferação linfocitária foi avaliada por uso do Citômetro de Fluxo FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

3.15. Análise estatística

Foi utilizado o *software* Prisma 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas. As comparações entre os grupos foram realizadas através do teste t em relação ao grupo controle, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil fenotípico das CTMs.

As CTMs de tecido adiposo utilizada nesse estudo apresentaram perfil fenotípico clássico de CTMs, sendo negativas para os marcadores CD34, CD11b, CD19, CD45 e HLA-DR e positivas para os marcadores CD90, CD44, CD105 e CD73. Esse mesmo padrão se manteve para as CTMs que receberam os diferentes regimes de licenciamentos investigados nesse trabalho (Figura 3).

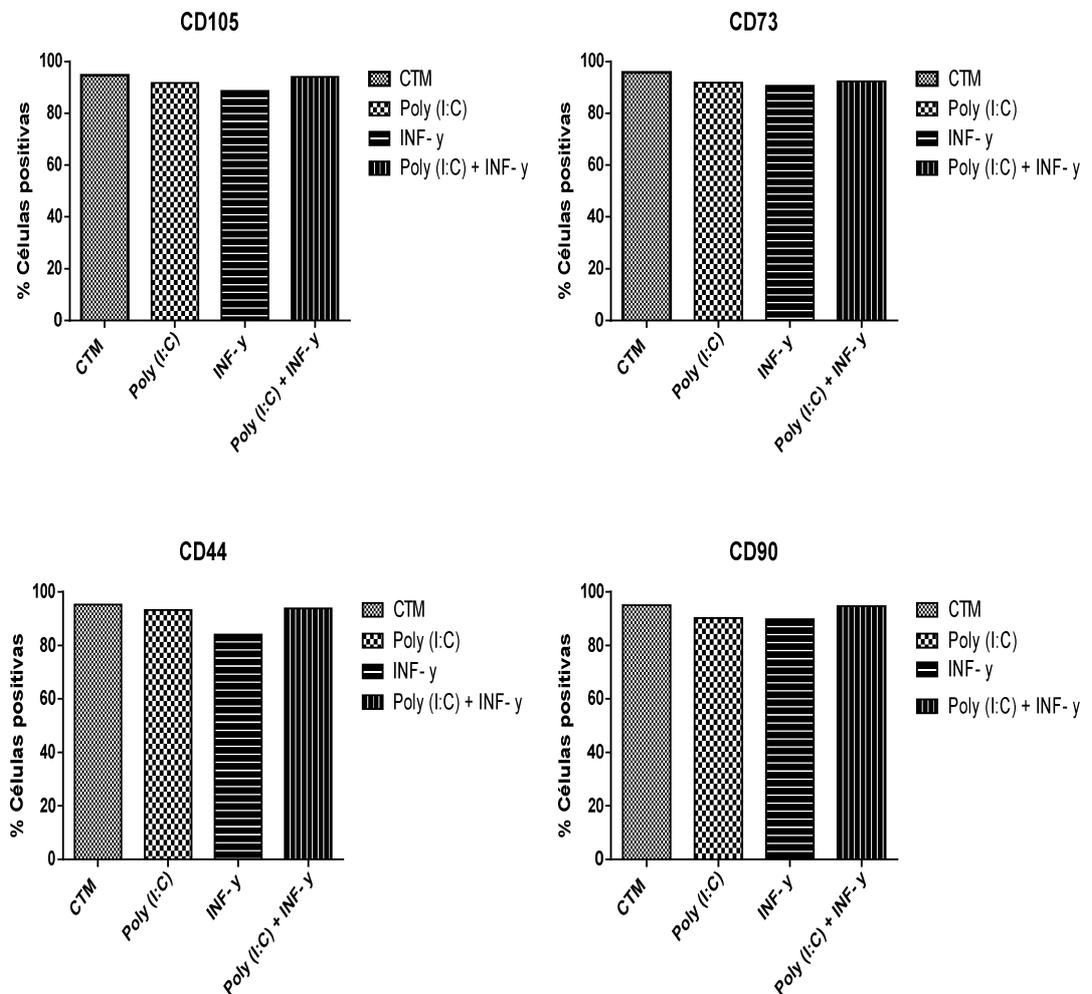


Figura 3: Fenotipagem das CTMs. Expressão de CD105, CD73, CD44 e CD90 por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas nesse estudo.

4.2. Poly (I:C) e INF- γ não induzem a proliferação de CTMs.

O licenciamento das CTMs com Poly (I:C) e INF- γ não alterou a proliferação nem a viabilidade dessas células, como pode ser visto na figura 4.

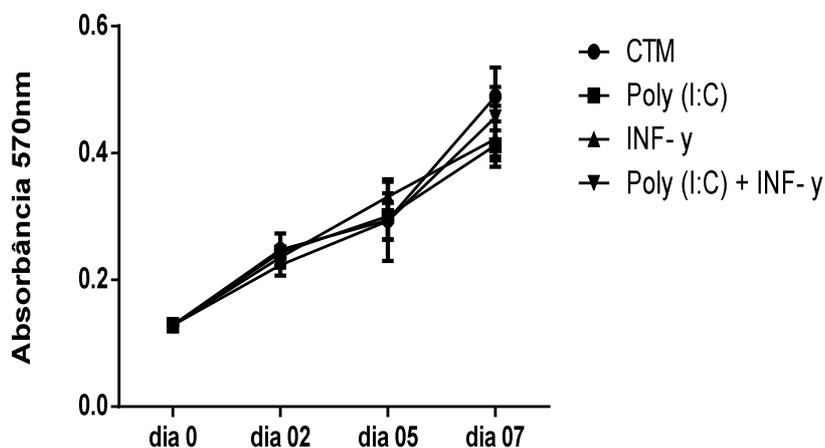
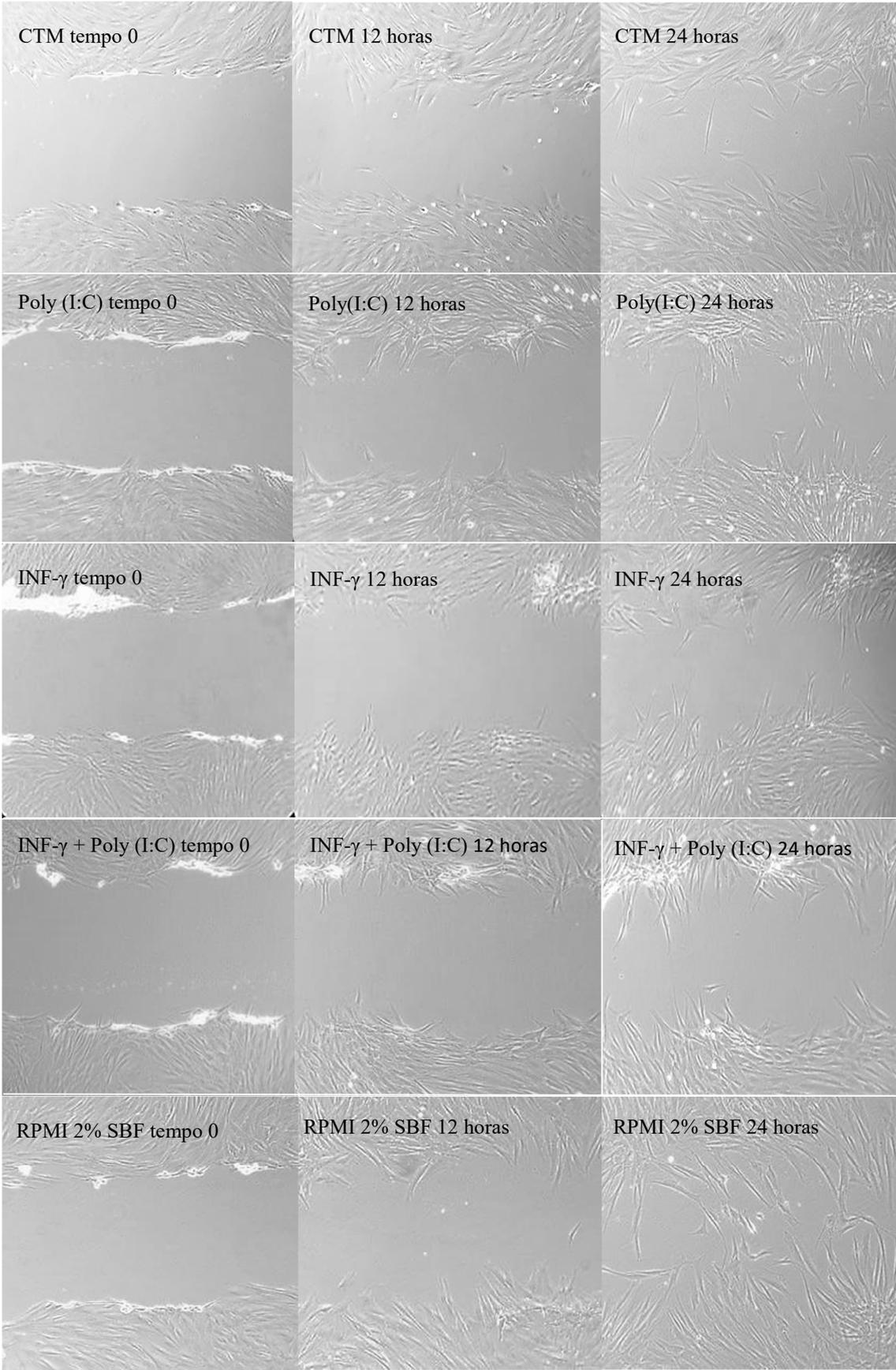


Figura 4: Análise da Viabilidade/Proliferação Celular: As CTMs foram licenciadas por 48 horas em diferentes regimes de licenciamento e submetidas a avaliação temporal da proliferação celular. Os valores são representados como média de uma quaduplicata. As análises foram realizadas por teste t não pareado. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas nesse estudo.

4.3. Poly (I:C) e INF- γ não estimulam a migração das CTMs.

As CTMs tratadas com Poly (I:C), INF- γ e Poly (I:C) + INF- γ não apresentaram maior potencial migratório quando comparadas as CTMs que não receberam tratamento. A observação microscópica foi validada pela análise de área livre, realizada pelo *Software ImageJ* (Figura 5).



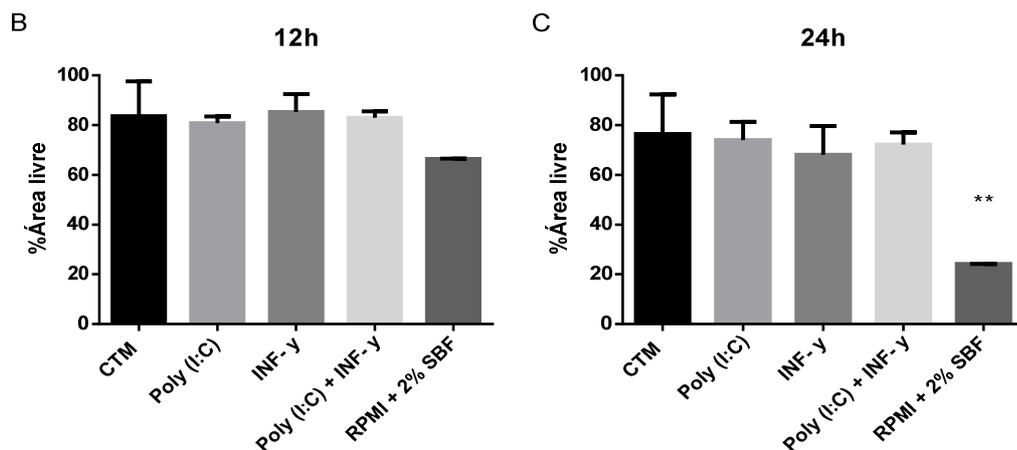


Figura 5. Migração das CTMs. (A) Migração de células mesenquimais não tratadas e tratadas com Poly (I:C) e INF- γ . As imagens foram obtidas no microscópio Primo Vert (Carl Zeiss). (B) Porcentagem de área livre em ensaio de migração após 12h e (C) 24h de experimento. ** $p=0,002$. Os grupos independentes foram avaliados por teste t não pareado. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas nesse estudo.

4.4. INF- γ potencializa o poder imunossupressivo das CTMs

As CTMs foram capazes de suprimir a proliferação dos linfócitos T ($p=0,0003$) (Figura 6a). O licenciamento das CTMs com INF- γ por 48 horas levou à maior supressão da proliferação dos linfócitos T, aumentando o potencial supressivo das CTMs quando comparado a CTMs que não receberam tratamento ($p=0,03$) (Figura 6b).

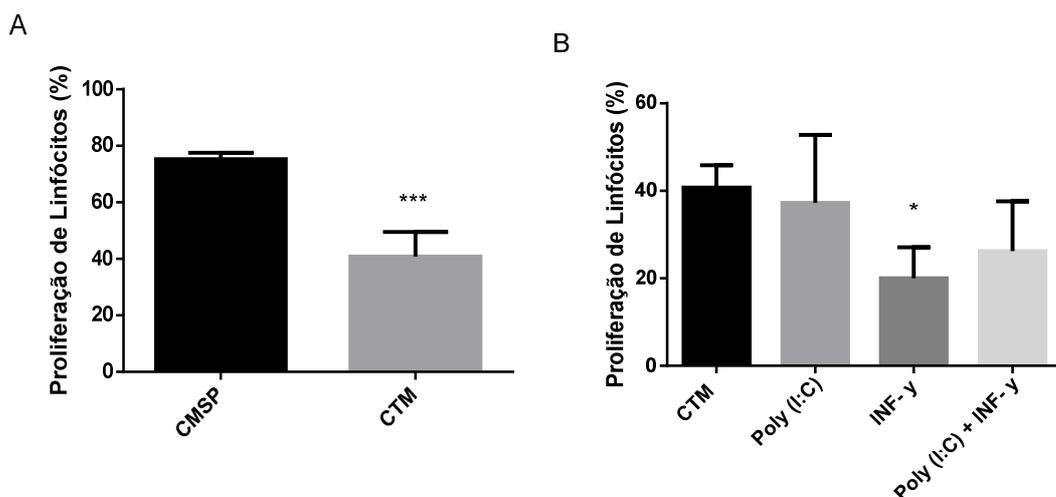


Figura 6. Cocultivo de CMSP com CTMs. (A) Representação gráfica da proliferação celular avaliada por citometria de fluxo. (B) O licenciamento de CTMs com INF- γ por 48 horas realçou o potencial supressivo dessas células sobre os linfócitos. Grupos independentes foram analisados pelo teste t não pareado. *** significa $p=0,0003$ e * $p=0,03$. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas nesse estudo.

4.5. Sobrenadantes de CTMs licenciadas não apresentam vantagem imunossupressiva

O sobrenadante obtido da cultura de CTMs foi capaz de modular a proliferação dos linfócitos T ($p=0,001$). Como pode ser visto, nenhum dos tratamentos prévios das CTMs foi capaz de realçar esse potencial supressivo (Figura 7).

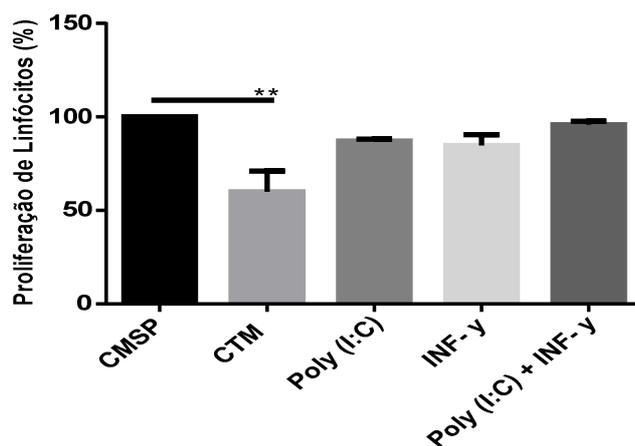


Figura 7. Proliferação de linfócitos cultivados com sobrenadante de CTMs licenciadas e não licenciadas. Representação gráfica da proliferação celular avaliada por Citometria de Fluxo, sendo a divisão dos linfócitos cultivados isoladamente ajustada para 100%. O símbolo ** indica $p=0,001$. Os grupos independentes foram avaliados com teste t não pareado. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas nesse estudo.

4.6. INF- γ isolado ou em combinação com Poly (I:C) aumenta a expressão de ICAM em CTMs

As CTMs apresentaram expressão média de VCAM e ICAM de 14,38 e 54,06, respectivamente. O tratamento das CTMs com INF- γ e com Poly (I:C) + INF- γ por 48 horas foi capaz de aumentar os níveis de expressão de ICAM nas CTMs ($p=0,01$ e $p=0,03$). Nenhum tratamento induziu aumento na expressão de VCAM (Figura 8).

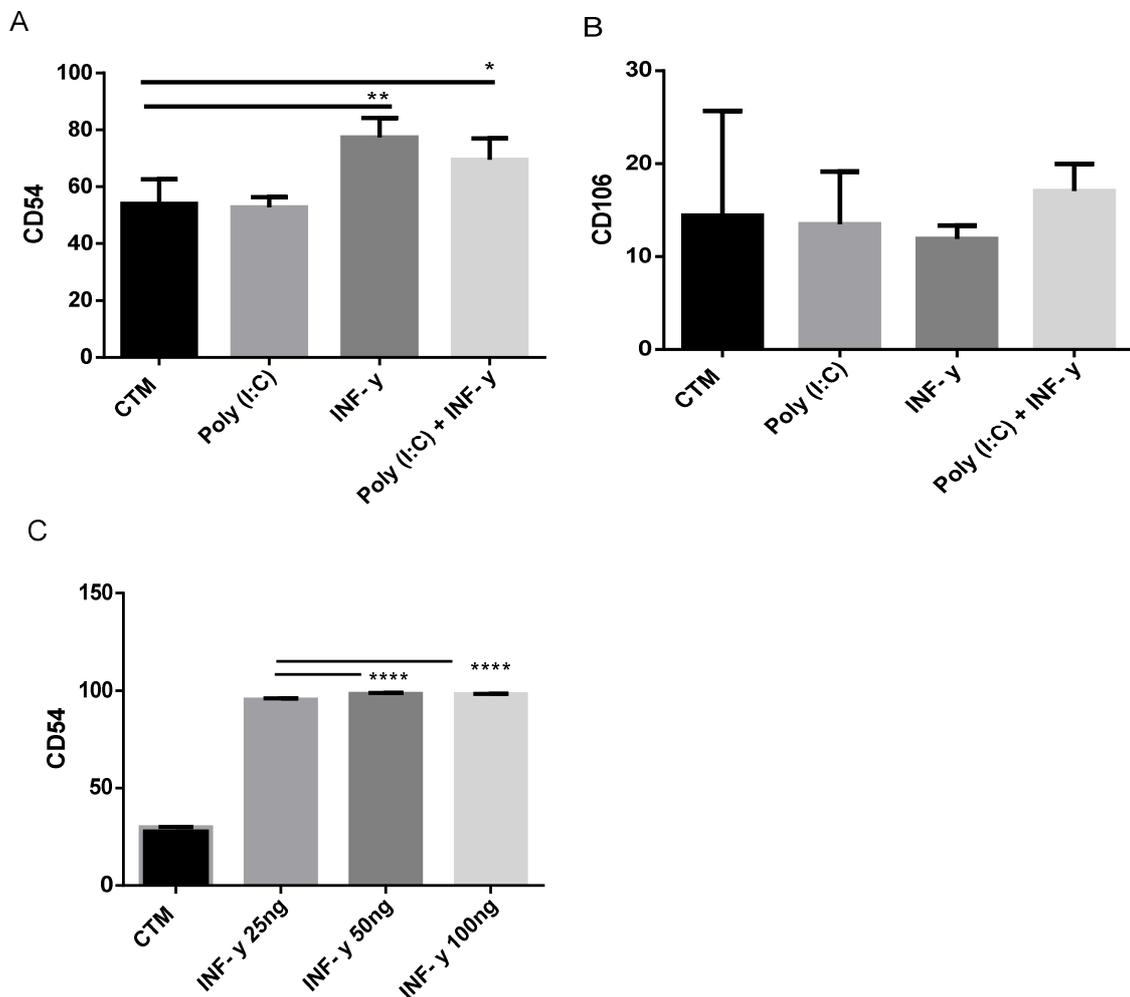


Figura 8. Expressão de ICAM e VCAM. (A) O tratamento das CTMs com INF- γ e com Poly (I:C) + INF- γ , foi capaz de aumentar o nível de expressão de ICAM. (B) Nenhum dos tratamentos das CTMs foi capaz de realçar a expressão de VCAM. (C) As concentrações de 50ng/mL e 100ng/mL resultaram em aumento da expressão de ICAM quando comparadas a concentração de 25ng/mL. **** significa $p=0,001$; *** $p=0,01$ e * $p=0,03$ e Os grupos independentes foram analisados pelo teste t não pareado.

4.7. Expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs

As CTMs utilizadas nesse estudo apresentaram expressão média de RTT 3 e RTT 4 de 88,83 e 80,09, respectivamente. O licenciamento das CTMs por 48 horas com Poly (I:C) e INF- γ não exerceu influência na expressão desses receptores, conforme pode ser observado na figura 9.

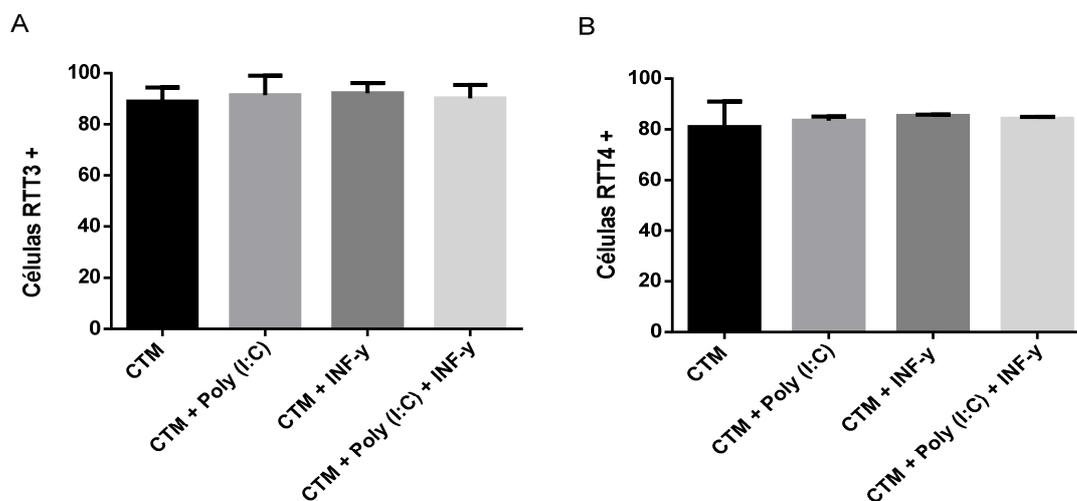
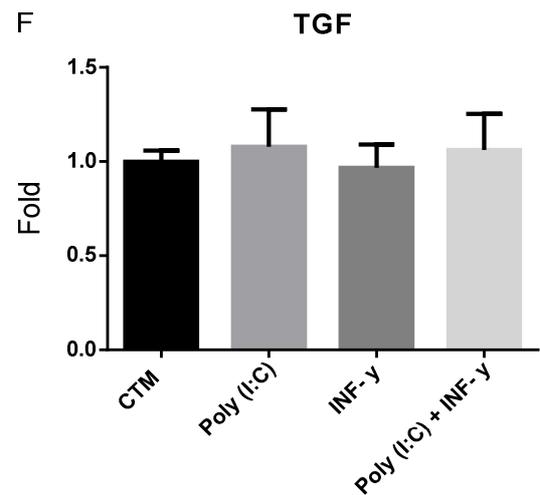
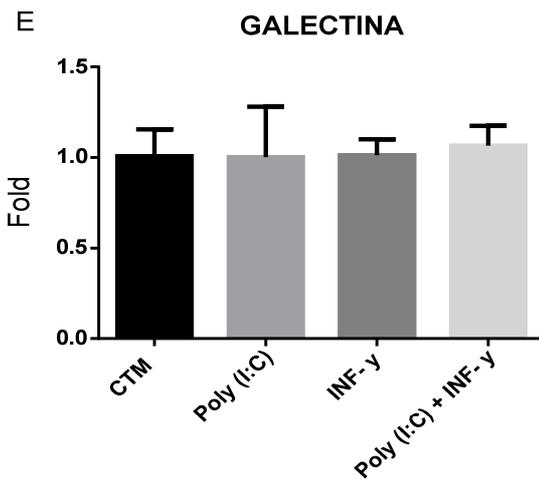
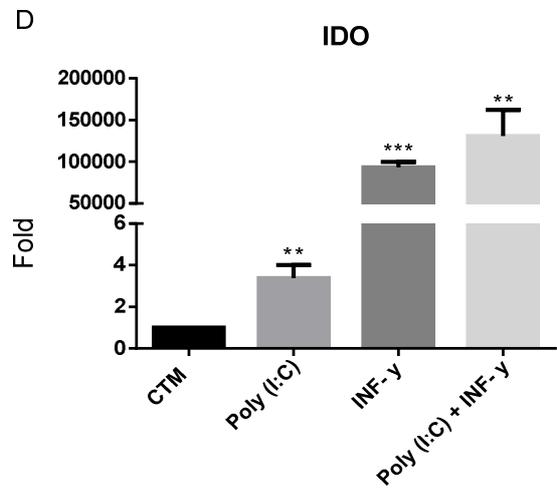
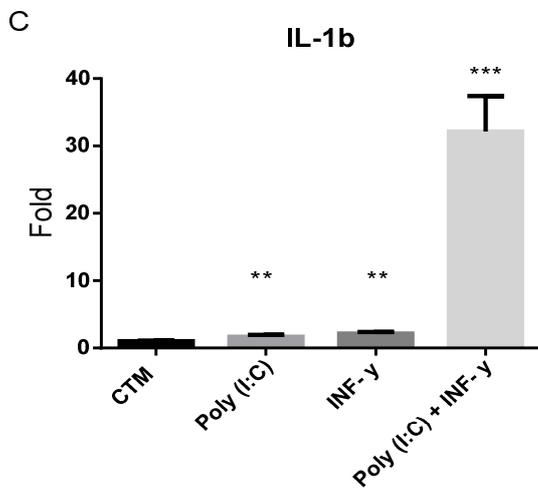
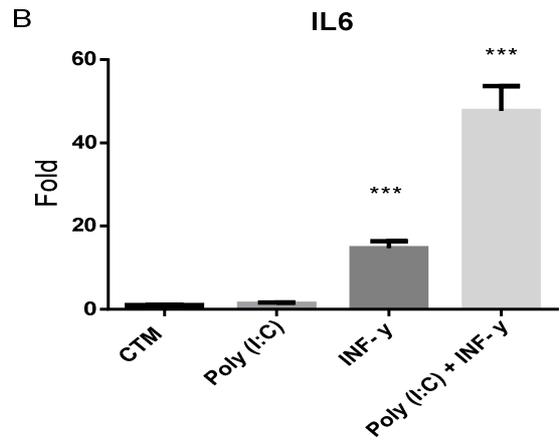
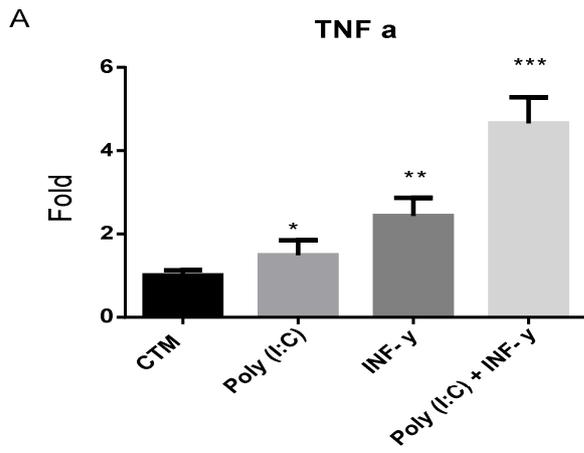


Figura 9. Expressão de receptores RTT3 e RTT4. A expressão de receptores do tipo toll 3 e 4 em CTMs foi avaliada por Citometria de Fluxo. Os tratamentos não exerceram influência na expressão de RTT3 e RTT4. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas nesse estudo.

4.8. Perfil de expressão gênica das CTMs

O tratamento das CTMs por 48h com INF- γ aumentou o nível de transcrição de IDO ($p < 0,0001$), TNF- α ($p = 0,002$), IL-6 ($p < 0,0001$) e IL-1 β ($p = 0,001$), enquanto que o tratamento com Poly (I:C) aumentou a transcrição de TNF- α ($p = 0,04$), IDO ($p = 0,001$) e IL-1 β ($p = 0,008$). O tratamento concomitante de Poly (I:C) e INF- γ aumentou a expressão dos genes TNF- α ($p = 0,0003$), IL-6 ($p < 0,0001$), IL-1 β ($p = 0,0003$) e IDO ($p = 0,001$), comparando com CTMs não tratadas (Figura 10).



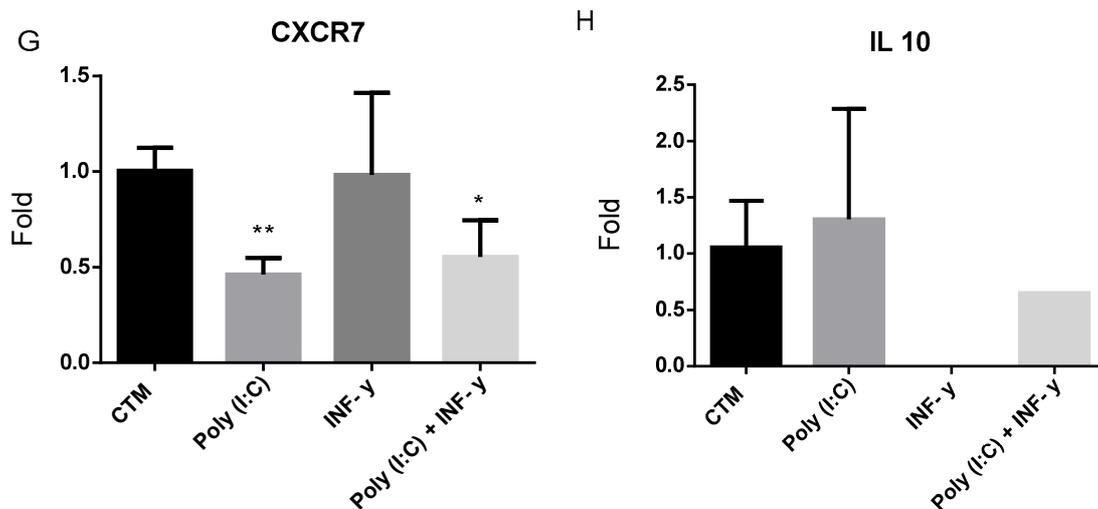


Figura 10. Expressão gênica das CTMs. (A) Expressão do gene TNF- α . (B) Expressão do gene IL-6. (C) Expressão do gene IL-1b. (D) Expressão do gene IDO. (E) Expressão do gene Galectina. (F) Expressão do gene TGF. (G) Expressão do gene CXCR7. (H) Expressão do gene IL-10. Os símbolos significam: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.9. Isolamento e caracterização das microvesículas.

As microvesículas obtidas tiveram tamanho médio de 262.4 nm, concentração proteica de 12,10 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram expressão para os marcadores CD90 e CD105 (Figura 11).

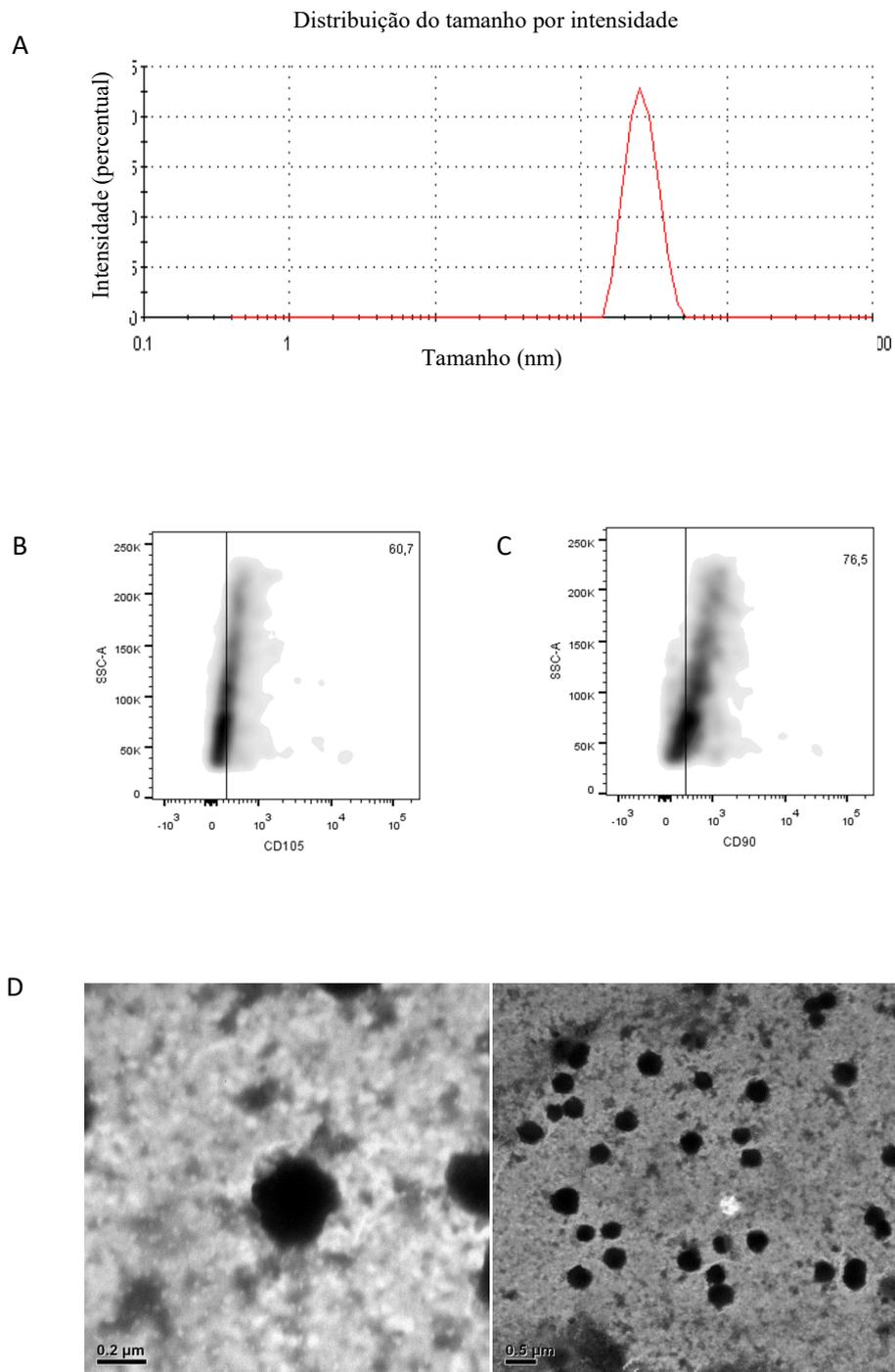


Figura 11. Caracterização física e fenotípica das microvesículas. As microvesículas obtidas a partir do sobrenadante de uma das CTMs utilizadas nesse estudo, foram caracterizadas pelo seu tamanho médio (A) e quanto a expressão de CD105 (B) e CD90 (C). (D) Imagem das microvesículas por microscopia eletrônica de transmissão.

4.10. Efeito imunossupressor das microvesículas.

O uso de microvesículas obtidas de CTMs, na concentração de 0,7 μ g, suprimiu a proliferação linfocitária como pode ser observado na figura 12 (p=0.0017).

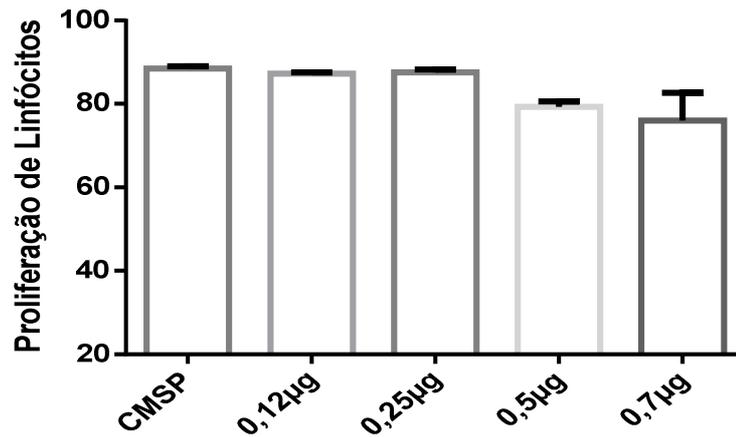


Figura 12. Efeito das microvesículas obtidas de CTMs sobre a proliferação de linfócitos. Microvesículas obtidas de CTMs foram quantificadas quanto a seu conteúdo proteico e adicionadas na cultura de CMSP ativados por fitohemaglutinina. Após 5 dias, a proliferação celular foi avaliada por Citometria de Fluxo.

5. DISCUSSÃO

Considerando as problemáticas do campo, nesse estudo buscamos uma estratégia capaz de realçar o potencial supressivo das CTMs e o modelo mais indicado para uma possível terapia livre de células. Além disso, avaliamos as alterações que as diferentes estratégias de licenciamento investigadas poderiam provocar nas propriedades biológicas e no perfil transcricional das CTMs.

As CTMs de tecido adiposo utilizadas nesse estudo apresentaram perfil fenotípico clássico de CTMs (DOMINICI et al., 2006), mesmo mediante tratamento com INF- γ e Poly (I:C). Esses dados sugerem que os diferentes tipos de tratamentos realizados devem manter as propriedades básicas das CTMs.

Diversos estudos *in vitro* foram conduzidos no intuito de avaliar a presença dos RTT em CTMs de diferentes fontes, uma vez que há descrição de que a sinalização desses receptores pode polarizar as células para um estado anti-inflamatório ou pró-inflamatório (WATERMAN et al., 2010; OLIVEIRA-BRAVO et al., 2016; LIEKE et al., 2009; RAICEVIC et al., 2011). Nesse trabalho, mostramos que as CTMs, licenciadas ou não, apresentam expressão de RTT 3 e RTT 4, e que o condicionamento das CTMs com Poly (I:C) e INF- γ não altera a expressão desses receptores. Corroborando com nossos resultados, outros estudos demonstraram a expressão de RTT 2, 3, 4 e 9 em CTMs de tecido adiposo (HWA-CHO et al., 2006; LOMBARDO et al., 2009; RAICEVIC et al., 2011; ROMIEU-MOUREZ et al., 2009; WANG; LI; ZHAO, 2016).

A descoberta de uma estratégia de licenciamento capaz de realçar a proliferação das CTMs seria de fundamental importância, haja vista que o seu efeito supressivo é dependente do número de células (NICOLA et al., 2002). É interessante, pois tem sido descrito que a ativação de RTT9 estimula a proliferação de CTMs de tecido adiposo (HWA-CHO et al., 2006), enquanto que o licenciamento de CTMs com Poly (I:C) inibe a proliferação dessas células (CHEN et al., 2013). No nosso estudo não observamos efeito na proliferação das CTMs através da sinalização de RTT 3. Também, não encontramos efeito sobre a proliferação das CTMs, quando essas células foram tratadas com INF- γ . Diferentemente, um estudo prévio demonstrou que IFN- γ inibiu a proliferação de CTM humana e de camundongo via ativação de IDO (LAMOURY et al., 2011). Apesar das CTMs de diversas fontes apresentarem as características básicas preestabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, as

CTMs derivadas de medula óssea e cordão umbilical apresentaram diferenças na capacidade proliferativa e na expressão de antígenos de superfície (DE UGARTE et al., 2003), o que pode explicar as discordâncias entre o nosso estudo e os supracitados.

A capacidade de migração das CTMs é alvo de intensa investigação científica e a potencialização dessa função tem importância particular, pois poderia aumentar a capacidade dessa célula de migrar para sítios inflamatórios para exercer seus efeitos biológicos (SOHNI et al., 2013). O efeito da sinalização de RTT 3 sobre a migração das CTMs é extremamente contraditório. No nosso estudo demonstramos que a sinalização das células com agonista de RTT 3 não exerceu efeitos sobre seu potencial de migração. Ao contrário, um estudo prévio mostrou que a sinalização de RTT 3 com Poly (I:C) induz maior migração de CTMs oriundas de medula óssea (TOMCHUCK et al., 2008). Apesar de ter sido descrito que INF- γ é capaz de aumentar o potencial migratório de macrófagos (HU et al., 2005), o condicionamento de CTMs com INF- γ não foi capaz de realçar o potencial de migração dessas células. Em linha, não observamos aumento na expressão do gene que codifica a proteína de migração CXCR7 quando comparamos as CTMs licenciadas com INF- γ e as CTMs sem tratamento. Do mesmo modo, a associação de Poly (I:C) com INF- γ também não induziu vantagem migratória às CTMs.

Neste trabalho mostramos que o licenciamento das CTMs com Poly (I:C) não promoveu incremento no seu potencial supressor, quando comparado às CTMs que não receberam tratamento. Entretanto, foi demonstrado que esse agonista aumentou significativamente os efeitos imunossupressores de CTMs de medula óssea e cordão umbilical em estudo realizado em modelo murino (CHEN et al., 2013; OPITZ et al., 2009; VEGALLETTER et al., 2016). Nossos resultados corroboram com os encontrados por Raicevic e colaboradores, em que utilizando reação mista de linfócitos e duas fontes de CTMs de origem humana - tecido adiposo e geleia de Wharton - Poly (I:C) não aumentou o potencial supressivo das células utilizadas (RAICEVIC, et al., 2011). Do mesmo modo, Lombardo e colaboradores demonstraram que o potencial imunossupressivo das CTMs de tecido adiposo de origem humana, após a estimulação de ligantes de RTT, permaneceu inalterado (LOMBARDO et al., 2009).

Embora não pareça influenciar o potencial migratório das CTMs, o INF- γ parece ser promissor no que diz respeito a imunomodulação exercida por essas células. Foi demonstrado em um modelo murino que o tratamento das CTMs com INF- γ poderia suprimir a DECH de

forma muito mais eficiente do que quando se usa CTMs não ativadas (POLCHERT et al, 2008).

Esse aumento da capacidade supressiva das CTMs licenciadas com INF- γ , em modelo murino, parece ocorrer por participação de óxido nítrico e prostaglandina E2 (SZABO et al., 2015). No nosso estudo, utilizando células humanas, também demonstramos que as CTMs licenciadas com INF- γ apresentam capacidade imunossupressiva superior as CTMs não tratadas. Esse resultado é biologicamente importante, pois pode diminuir a exigência de números de CTMs para uso clínico, além de garantir células mais eficientes.

Recentemente, um estudo de análise proteômica em larga escala demonstrou que o licenciamento das CTMs com IFN- γ altera significativamente os níveis de expressão de algumas proteínas de adesão e de IDO (GUAN et al., 2017). De fato, as CTMs exercem sua atividade de imunomodulação através de vários mecanismos, dentre eles através das moléculas de adesão VCAM e ICAM. Já foi demonstrado que o bloqueio da expressão dessas moléculas diminui a capacidade imunossupressora das CTMs (GAJEWSKI et al., 2006). Em linha, demonstramos nesse trabalho que o licenciamento das CTMs com IFN- γ foi capaz de elevar o nível transcricional de IDO e de realçar a expressão da molécula de adesão ICAM. Nesse panorama, ainda é importante notar que a estratégia promissora de tratamento das CTMs com Poly (I:C) e IFN- γ também induziu aumento transcricional de IDO, mas não garantiu vantagem no potencial imunossupressor dessas células. Além disso, esse mesmo tratamento também levou a maior produção do transcrito IL-1 β , uma citocina classicamente envolvida na proliferação de linfócitos T humanos (CHU et al, 1984).

Ainda, foi demonstrado que além de atuar na promoção de IDO, IFN- γ induz aumento da expressão de PD-L1 em CTMs de medula óssea, o que constitui um mecanismo de supressão imune exercido por essas células através do eixo PD1/PD-L1 (AUGELLO et al., 2005; GUAN et al., 2017).

Apesar de IDO ser um fator solúvel importante envolvido nos mecanismos imunossupressivos das CTMs, quando usamos o sobrenadante das CTMs licenciadas por INF- γ não notamos aumento no potencial supressivo dessas células. Apenas encontramos esse desfecho quando se permite o contato célula-célula. Esses dados sugerem fortemente que pode haver importante papel de ICAM nesse processo ou que a secreção de IDO pelas CTMs possa ser dependente da presença constante da célula licenciada.

Em um estudo utilizando sobrenadantes de CTMs de medula óssea, foi demonstrado que apenas o sobrenadante dessas células foi capaz de suprimir a proliferação de linfócitos (RYAN et al., 2007). Similarmente, demonstramos que o sobrenadante de CTMs de tecido adiposo também é capaz de suprimir a proliferação dos linfócitos, o que endossa a tese de que fatores solúveis estão envolvidos na mediação da inibição da proliferação de células T. Mais importante, nossos resultados sugerem que as CTMs possam produzir moléculas com capacidade supressiva de modo constitutivo, independente dessas células estarem ou não em meio inflamatório.

Como pôde ser visto, com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos moleculares através dos quais as CTMs são capazes de exercer suas propriedades imunossupressoras, avaliamos por PCR em tempo real o nível de expressão gênica de alguns componentes importantes nesse cenário. Observamos que o tratamento das CTMs com Poly (I:C) induziu aumento de TNF- α e um discreto aumento na expressão de IL-1b. Do mesmo modo, Wang demonstrou que o tratamento de CTMs de tecido adiposo com Poly (I:C) aumentou o nível transcricional de IL-1b e TNF- α , o que corrobora com os resultados do nosso estudo (WANG; LI; ZHAO, 2016). Acerca da expressão de TNF- α , estudos realizados em CTMs de origem de medula óssea parecem contraditórios, pois trabalhos demonstram que após estimulação de RTT 3 ou RTT 4 ocorre uma redução no nível de expressão gênica para esse fator, enquanto outros trabalhos demonstram que ocorre uma manutenção nos níveis de TNF- α (TOMCHUCK et al., 2008; ROMIEU-MOUREZ et al., 2009; WANG; LI; ZHAO, 2016; CASSATELA et al., 2011; GRAY et al., 2015).

Um estudo pregresso demonstrou que TNF- α em sinergia com IL-6 pode estimular a proliferação de células T (KUHWEIDE et al, 1990). Nos resultados obtidos nesse trabalho, observamos que todas as estratégias de licenciamento promoveram aumento transcricional de TNF- α , o que pode explicar nossos resultados quando usamos sobrenadante para controlar a resposta imune. Outro ponto relevante nesse cenário é que todas as estratégias de licenciamento aumentam a expressão de IL-1b, uma citocina de potente atividade pró-inflamatória (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010).

Ainda que não tenhamos investigado a geração de Tregs, investigamos a expressão de TGF- β , o principal fator envolvido na geração dessas células. Nossas estratégias de licenciamento não potencializaram a expressão desse fator de crescimento, o que indica que essas medidas de licenciamento podem não influenciar na geração de linfócitos supressores

(MACCARIO et al, 2005). Além disso, nossas estratégias de licenciamento também não potencializaram a expressão de galectina, uma proteína relacionada a imunomodulação das CTMs (SIOUD, 2011).

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de supressão com sobrenadante, escolhemos a condição que melhor controlou a proliferação dos linfócitos T e isolamos as microvesículas para caracterização e para testar a capacidade supressiva desse produto. As microvesículas obtidas a partir do sobrenadante das CTMs apresentaram marcadores de superfície das CTMs e, mais importante, observamos que esses produtos são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T *in vitro*. Esse achado corrobora com uma publicação recente que também encontrou efeito imunossupressivo em microvesículas de CTMs de medula óssea (CONFORTI et al., 2014). Mais importante, nossos dados indicam que nenhum dos principais métodos investigados para licenciamento das CTMs é capaz de garantir maior capacidade supressiva aos produtos gerados por essas células.

Em suma, demonstramos que o tratamento das CTMs com INF- γ aumenta o seu potencial imunossupressivo, o que poderia ser explicado pela maior produção de IDO e pela maior expressão da molécula de adesão ICAM. Entretanto, no que diz respeito ao modelo de terapia livre de células, nenhuma estratégia adotada se mostrou superior ao sobrenadante obtido das CTMs sem tratamento. Além disso, demonstramos que as microvesículas obtidas pelas CTMs foram capazes de suprimir a proliferação dos linfócitos, o que é particularmente relevante considerando-se a possibilidade de terapia com produtos celulares. Em conjunto, nossos achados são importantes na área em que se inserem por mostrarem os mecanismos envolvidos no tratamento das CTMs com INF- γ e para nortear novos estudos que busquem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras, livres de células.

6. CONCLUSÃO

- CTMs de tecido adiposo inibem a proliferação de Linfócitos T;
- CTMs de tecido adiposo expressam RTT 3 e RTT 4;
- CTMs de tecido adiposo expressam VCAM e ICAM;
- INF- γ aumenta a expressão de ICAM em CTMs;
- INF- γ não realça o potencial de migração e proliferação de CTMs de tecido adiposo;
- INF- γ realça o potencial supressivo das CTMs
- Poly (I:C) não realça o proliferação, migração e potencial supressivo de CTMs de tecido adiposo;
- Poly (I:C) e INF- γ juntos não realçam a proliferação, migração e potencial supressivo de CTMs de tecido adiposo;
- INF- γ induz aumento da expressão de IDO ,TNF- α , IL-6 e IL-1 β ;
- Poly (I:C) aumentou a transcrição de TNF- α e IL-1 β ;
- Poly (I:C) e INF- γ juntos aumentaram a expressão dos genes TNF- α , IL-6, IL-1 β e IDO;
- O sobrenadante de CTM de tecido adiposo inibe a proliferação de Linfócitos T;
- O sobrenadante de CTM de tecido adiposo licenciada não é capaz de realçar o potencial supressivo sobre Linfócitos T; e
- Microvesículas isoladas a partir de sobrenadante de CTMs de tecido adiposo são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista a importância das propriedades de imunomodulação exercidas por CTMs, nossos achados mostram que o tratamento de CTMs com INF- γ foi capaz de garantir maior efeito supressivo às CTMs. Apesar dos sobrenadantes das CTMs licenciadas não se mostrarem mais vantajosos no que diz respeito ao potencial de supressão de linfócitos T, demonstramos que o sobrenadante de CTM de tecido adiposo também é capaz de suprimir a proliferação celular o que é um achado positivo para nortear novas estratégias terapêuticas. Nessa linha de investigação, torna-se ainda relevante testar, em modelo experimental relevante de DECH, se o sobrenadante de CTMs e as microvesículas produzidas por essas células induzem a resolução dessa patologia.

8. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p.1815-1822, 2005.
- ANDALOUSSI, S. E. L., MAGER, I., BREAKFIELD, X. O.; WOOD, M. J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discov**, v. 12, p. 347–357, 2013.
- AUGELLO, A.; TASSO, R.; NEGRINI, S. M.; et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. **European Journal of Immunology**, v. 35, p. 1482-1490, 2005.
- BARNES, D.W.; LOUTIT, J.F.; MICKLEM, H.S. “Secondary disease” of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 99, p. 374–385, 1962.
- BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 42–48, 2002.
- BILLINGHAM, R.E. The biology of graft-versus-host reactions. **Harvey Lect**, v. 62, p. 21–78, 1966.
- BOBRIE, A.; COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THERY, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, v.12, p. 1659-1668, 2011.
- BREITBACH, M.; BOSTANI, T.; ROELL, W.; et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1362-1369, 2007.
- BRUNO, S.; GRANGE, C.; DEREGIBUS, M.C.; et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n.5, p. 1053-1067, 2009.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p.1076-1084, 2006.
- CASSATELA, M. A.; MOSNA, F.; MICHELETTI, A.; et al. Toll-Like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils. **Stem Cells**, v. 29, p. 1001-1011, 2011.
- CHEN, D.; MA, F.; XU, S.; et al. Expression and role of Toll-like receptors on human umbilical cord mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 4, p. 423-433, 2013.
- CHEN, X.; ZHANG, Z.; ZHOU, H.; ZHOU, G. Characterization of mesenchymal stem cells under the stimulation of Toll-like receptor agonists. **Development, Growth & Differentiation**, v. 56, p. 233-244, 2014.
- CHU, E.; ROSENWASSER, L. J.; DINARELLO, C.A.; et al. Role of interleukin 1 in antigen-specific T cell proliferation. **Journal Immunology**, v. 132, n. 3, p.1311-6, 1984

COLLINO, F.; DEREGIBUS, M.C.; BRUNO, S.; et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. **PLoS One**, v. 5, n. 7, 2010.

CONFORTI, A.; SCARSELLA, M.; STARC, N.; et al. Microvesicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 21, p. 2592-2599, 2014.

COVAS, D.T.; PANEPUCCI, R.A.; FONTES, A.M.; et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 5, p. 642-654, 2008.

DANDER, E.; LUCCHINI, G.; VINCI, P. et al. Mesenchymal stromal cells for the treatment of graft-versus-host disease: understanding the in vivo biological effect through patient immune monitoring. **Leukemia**, v. 26, n. 7, p. 1681-1684, 2012.

DELAROSA, O.; LOMBARDO, E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

DE LIMA, M.; MACNIECE, I.; ROBINSON, S. N.; et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. **New England Journal of Medicine**, v. 367, p. 2305-2315, 2012.

DE UGARTE, D. A.; ALFONSO, Z.; ZUKA, P. A.; et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunology Letters**, v. 89, n.2-3, p. 267-70, 2003.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.

ENGLISH, K.; BARRY, F. P.; FIELD-CORBETT, C. P.; MAHON, B. P. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology letters**, v. 110, n. 2, p. 91–100, 2007.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970.

GATTI, S.; BRUNO, S.; DEREGIBUS, M. C.; et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, p.1474-1483, 2011.

GAJEWSKI, T.F.; MENG, Y.; BLANK, C.; et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. **Immunological Reviews**, v. 213, p. 131-145, 2006.

GOOLAERTS, A.; PELLAN-RANDRIANARISON, N.; LARGHERO, J.; et al. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial

permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 11, p. 975–985, 2014.

GUAN, Q.; EZZATI, P.; SPICER, V.; et al. Interferon γ induced compositional changes in human bone marrow derived mesenchymal stem/stromal cells. **Clinical Proteomics**, v. 6, p. 14-16, 2017.

GRAY, A.; MAGUIRE, T.; RENE, S.; et al. Identification of IL-1 β and LPS as optimal activators of monolayer and alginate-encapsulated mesenchymal stromal cell immunomodulation using design of experiments and statistical methods. **Biotechnology Progress**, vol. 31, n. 4, p. 1058–1070, 2015.

HERBERTS, C. A.; KWA, M. S.; HERMSEN, H.P. Risk factors in the development of stem cell therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 29, 2011.

HWA-CHO, H.; YONG, C.B.; JIN, S.J. Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 2744–2752, 2006.

HU, X.; PARK-MIN, K. H.; HO, H. H.; IVASHKIV, L. B. IFN- γ -Primed Macrophages Exhibit Increased CCR2-Dependent Migration and Altered IFN- γ Responses Mediated by Stat1. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3637-3647, 2005.

KRAMPERA, M.; GLENNIE, S.; DYSON, J.; et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3722–3729, 2003

KRAMPERA, M.; COSMI, L.; ANGELI, R.; A et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p.386–398, 2006.

KUHWEIDE, R.; DAMME, V.; CEUPPENS, J. L. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 synergistically induce T cell growth. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 5, p. 1019-1025, 1990.

LAI, R. C.; CHEN, T. S.; LIM, S. K. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. **Regen Med**, v. 6, p. 481-492, 2011.

LAMOURY, J. C.; FRANCOIS, M. J. L.; CARISTO, M.; et al. Interferon- γ Regulates the Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Activation of Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO). **PLoS One**. 2011.

LE BLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439–1441, 2004.

LEE, S. H.; LEE, M. W.; YOO, K. H.; et al. Co-transplantation of third-party umbilical cord blood-derived MSCs promotes engraftment in children undergoing unrelated umbilical cord blood transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, p. 1040-1045, 2013.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

- LI, H. C.; SOTICOV, C.; ROGERS, A. B.; HOUGHTON, J. M. Stem cells and cancer: Evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 363–371, 2006.
- LIEKE, C. J. B.; JANSEN, B. J.; SIEBERS-VERMEULEN, K. G.; et al. Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 9B, p. 3415-3426, 2009.
- LIOTTA, F.; ANGELI, R.; COSMI, L.; et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. **Stem Cells**, v. 1, p. 279-289, 2008.
- LIU, K.; CHEN, Y.; ZENG, Y.; et al. Coinfusion of mesenchymal stromal cells facilitates platelet recovery without increasing leukemia recurrence in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: a randomized, controlled clinical study. **Stem Cells and Development**, v. 20, p. 1679-1685, 2011.
- LOMBARDO, E.; DELAROSA, O.; MANCHEÑO-CORVO, P.; et al. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. **Tissue Engineering Part A**, v.15 , n. 7, p. 1579-89, 2009.
- MACCARIO, R.; PODESTÀ, M.; MORETTA, A.; et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica/the hematology journal*, v. 90, n. 4, p. 516–525, 2005.
- MEIRELLES, L. S.; FONTES, A. M.; COVAS, D.T.; CAPLAN, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, p. 419-427, 2009.
- MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2 , 3-dioxygenase – mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619–4622, 2004.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.
- NICOLA, M. DI; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838–3843, 2002.
- OLIVEIRA-BRAVO, M.; SANGIORGI, B. B.; SCHIAVINATO, J. L. S.; et al. LL-37 boosts immunosuppressive function of placenta-derived mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, p. 189, 2016.
- OPITZ, C.; LITZENBURGER, U.; LUTZ, C.; et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. **Stem Cells** v. 4, p. 909-919, 2009.

- PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.
- POLCHERT, D.; SOBINSKY, J.; DOUGLAS, G. W.; et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 1745–1755, 2008.
- PREVOSTO, C.; ZANCOLLI, M.; CANEVALI, P.; et al. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica**, v. 92, p. 881-888, 2007.
- PROCKOP, D. J.; OLSON, S. D. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: Let's not overlook some essential precautions. **Blood**, v. 109, p. 3147–3151, 2007.
- RAICEVIC, G.; NAJAR, M.; STAMATOPOULOS, B.; et al. The source of human mesenchymal stromal cells influences their TRL profile as well as their functional properties. **Cellular Immunology**, v. 270, p. 207-216, 2011.
- REN, G.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; et al. Mesenchymal stem cell mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**; v. 2, p. 141–150, 2008.
- RINGDEN, O.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. **Best Pract Res Clin Haematol**. V. 24, n. 1, p. 65–72, 2011.
- ROMIEU-MOUREZ, R.; FRANÇOIS, M.; BOIVIN, M. N.; et al. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. **Journal of Immunol**, v. 182, p. 7963-7973, 2009.
- RYAN, J. M.; BARRY, F.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, p. 353-363, 2007.
- SALDANHA-ARAÚJO, F.; FERREIRA, F. I. S.; PALMA, P. V.; et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem Cell Research**, v. 7, n. 1, p. 66–74, 2011.
- SALDANHA-ARAÚJO, F.; HADDAD, R.; FARIAS, K. C.; et al. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF- κ B signalling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 6, p.1232-1244, 2012.
- SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I.; et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 109, p. 228-234, 2007.
- SIOUD, M. New Insights into Mesenchymal Stromal Cell-Mediated T-Cell Suppression Through Galectins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 79-84, 2011.
- SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 14–16, 2013.

- SZABO, E.; FAJKA-BOJA, R.; KRISTON-PA, E.; et al. Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. **Stem Cells Development**, v. 24, n. 18, p. 2171-80, 2015.
- TIMMERS, L.; LIM, S. K.; HOEFER, I. E.; et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. **Stem Cell Research**, v. 6, p. 206–214, 2011.
- TOMCHUCK, S. L.; ZWEZDARYK, K. J.; COFFELT, S. B.; et al. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. **Stem Cells**, v. 26, p. 99–107, 2008.
- VEGA-LETTER, A M.; KURTE, M.; FERNÁNDEZ-O’RYAN, C.; et al. Differential TLR activation of murine mesenchymal stem cells generates distinct immunomodulatory effects in EAE. **Stem Cell Research & Therapy**, v 7, p. 150, 2016.
- VON BONIN, M.; STOLZEL, F.; GOEDECKE, A.; et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. **Bone Marrow Transplant**, v. 43, p. 245–251, 2009.
- TOMIC, S.; DJOKIC, J.; VASILIJIC, S.; et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. **Stem Cells Development**, v. 4, p. 695-708, 2011.
- WANG, L.; GU, Z.; ZHAO, X.; et al. Extracellular vesicles released from human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells prevent life-threatening acute graft-versus-host disease in a mouse model of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Stem Cells and Development**, v. 25, n.24, p. 1874–1883, 2016
- WANG, S.; LI, X.; ZHAO, R. C. Transcriptome analysis of long noncoding RNAs in Toll-like receptor 3-activated mesenchymal stem cells. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- 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**, 2010.
- WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci Signal**, v. 3, n. 105, p. cm1, 2010.
- WERNICKE, C.M.; GRUNEWALD, T. G.; JUENGER, H.; et al. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. **International Archives of Medicine**, v. 4, p. 27, 2011.
- WOOD, K.J.; BUSHELL, A.; HESTER, J. Regulatory immune cells in transplantation. Regulatory immune cells in transplantation **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 6, p. 417-30, 2012.
- YAMAMOTO-FURUSHO, J.; PODOLSKY, D. Innate immunity in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 42, p. 5577-5580, 2007.

YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R. M.; ANDREU, Z.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [physiology]. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, 2015.

ZHAO, X.; LIU, D.; GONG, W.; et al. The toll-like receptor 3 ligand, Poly IC, improves immunosuppressive function and therapeutic effect of mesenchymal stem cells on sepsis via inhibiting MiR-143. **Stem Cells**, v. 32, n. 2, p. 521-533, 2014.