

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**AMANDDA ÉVELIN SILVA DE CARVALHO**

**INFLUÊNCIA DO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO SOBRE O POTENCIAL  
IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

BRASÍLIA

2019

**AMANDDA ÉVELIN SILVA DE CARVALHO**

**INFLUÊNCIA DO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO SOBRE O POTENCIAL  
IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

BRASÍLIA

2019

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

Silva de Carvalho, Amandda Évelin

INFLUÊNCIA DO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. Amandda Évelin Silva de Carvalho; orientador Felipe Saldanha de Araújo. -- Brasília, 2019. 61 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2019.

1. Célula-tronco mesenquimal. 2. Imunossupressão. 3. DECH. 4. Licenciamento. I. Saldanha de Araújo, Felipe, orient.

AMANDDA ÉVELIN SILVA DE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO SOBRE O POTENCIAL  
IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovada em 18 de janeiro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

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

Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Sueli Soares Felipe - Universidade de Brasília

Dr. Jorge Vaz Pinto Neto – Centro de câncer de Brasília

BRASÍLIA

2019

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”

John Dewey

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Eliene e Édson por todo o suporte, carinho, paciência e por me incentivarem a dar sempre o meu melhor. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por me ensinarem a enfrentar obstáculos e por compreenderem meus momentos de ausência.

Um agradecimento especial à minha avó Elenita, por todos os ensinamentos e conselhos que levo comigo para a vida. A força de vontade e determinação com a qual criastes todos os seus filhos e que enfrenta toda e qualquer dificuldade é admirável! Tenho-lhe como um grande exemplo e referencial.

Ao meu esposo Flávio por ter me presenteado com nosso filho Henrique, o motivo que faz tudo isso valer a pena. Agradeço a vocês dois por todo o apoio, esforço, paciência, amor e compreensão. MUITÍSSIMO obrigada por tudo.

À minha sogra Ezilene, minha cunhada Celina e ao meu irmão Júnior por toda a ajuda, suporte e todo o carinho para com o meu filho. A ajuda de vocês foi essencial para que eu conseguisse chegar até aqui.

À minha tia Silvia que, desde que eu era criança, sempre foi uma das pessoas que mais me incentivava em assuntos referentes a estudos e me dava suporte em todos os aspectos.

Aos meus amigos por aceitarem todos os meus defeitos e sempre me incentivarem a persistir. Muito obrigada pelos conselhos, puxões de orelha, risadas e companheirismo.

Um agradecimento especial às gurias: Raquel, Luma, Marielly e Ana. Obrigada por todos os aprendizados, risadas, cafés, frustrações e por todo o apoio de vocês nos momentos mais críticos. Um agradecimento especial à Rachel por todos os conselhos, aventuras, papos de mãe e pelo ombro amigo de sempre. Todas nós temos muitas histórias para contar!

Ao professor Francisco e a todos os alunos, professores e funcionários do Laboratório de Farmacologia Molecular por possibilitarem a execução desse trabalho e pelo ambiente agradável e amigável. Admiro muito o espírito de coletividade que vocês compartilham.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Instituto de Cardiologia do Distrito Federal pela captação dos pacientes participantes do estudo.

Agradeço ao Dr. Gustavo Bettarello e às enfermeiras Roberta, Fernanda, Lorena e Ludimilla pelo suporte no manejo dos pacientes e coleta das amostras.

À professora Juliana Lott e a empresa *Cellseq solutions* pelo fornecimento das células que foram utilizadas nesse trabalho.

Ao Labiogene do Instituto de Biologia por permitirem o uso do Citômetro de Fluxo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo pela confiança em mim depositada e pelas oportunidades que me foram concedidas. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pela sua presença ativa na condução desse trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução desse trabalho. Muito obrigada.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Células-Tronco Mesenquimais.....	17
1.2. Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro .....	20
1.3. Licenciamento .....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivos Gerais.....	27
2.2. Objetivos Específicos .....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Obtenção das CTMs .....	28
3.2. Coleta dos plasmas de pacientes com DECH .....	28
3.3. Preparo do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP).....	28
3.4. Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs).....	29
3.5. Caracterização imunofenotípica das CTMs .....	29
3.6. Caracterização do perfil de citocinas do Plasma dos Pacientes com DECH .....	29
3.7. Licenciamento das CTMs com plasma de pacientes com DECH.....	30
3.8. Ensaio de Viabilidade/Proliferação Celular.....	30
3.9. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) e marcação com CFSE.....	31
3.10. Ensaio de Imunossupressão.....	31
3.11. Expressão de moléculas de Adesão ICAM-1 e VCAM-1 .....	32
3.12. Geração de linfócitos T regulatórios.....	32
3.13. PCR em tempo real.....	33
3.14. Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS .....	34
4.1. Perfil Fenotípico das CTMs de Tecido Adiposo.....	34
4.2. Caracterização dos plasmas .....	35
4.3. Dados Clínicos dos Pacientes com DECH.....	36
4.4. Plasmas de DECH não alteram a viabilidade/proliferação das CTMs .....	38

4.5. Licenciamento das CTMs com plasma de DECH realça a capacidade supressiva dessas células. ....	38
4.6. Licenciamento com Plasmas de DECH causa alterações morfológicas nas CTMs .....	39
4.7. Plasmas de DECH modulam a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em CTMs .....	41
4.8. Plasmas de DECH modulam a geração de células T regulatórias.....	41
4.9. Perfil Transcricional das CTMs licenciadas .....	42
5. DISCUSSÃO .....	44
6. CONCLUSÕES .....	48
7. REFERÊNCIAS.....	49

## RESUMO

**CARVALHO, Amandda Évelin Silva de. INFLUÊNCIA DO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. Brasília, 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.**

As Células-tronco mesenquimais (CTMs) têm recebido destaque como uma importante ferramenta para terapia celular devido às suas inúmeras características biológicas associadas à facilidade de obtenção e de expansão *in vitro*. Dentre as suas propriedades, a que mais chama atenção é a sua capacidade de interagir e modular o sistema imune. Os resultados mais expressivos desse potencial imunorregulador das CTMs têm sido observados no manejo e tratamento da Doença do Enxerto contra o hospedeiro (DECH). Essa doença é caracterizada por um processo inflamatório sistêmico mediado por células T do doador que reagem contra antígenos do receptor, resultando em danos em uma série de órgãos e tecidos. Entretanto, nesse cenário, nota-se que é necessário um elevado número de CTMs para se obter o efeito terapêutico desejado e nem todos os pacientes com DECH se beneficiam com essa terapia. Diante disso, há uma busca constante por estratégias que possam realçar as propriedades dessas células. No presente estudo estabelecemos uma estratégia inovadora de licenciamento submetendo as CTMs ao plasma de pacientes com DECH aguda e crônica, e investigamos os impactos dessa estratégia sobre as propriedades biológicas das CTMs. Apesar de apresentarem uma constituição heterogênea, de modo geral, os plasmas de pacientes com DECH apresentaram maior concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-15 quando comparados com o plasma de doadores saudáveis. Além disso, os plasmas de DECHc apresentaram maior concentração de IL-10 em relação aos plasmas de DECHa. Mais importante, alguns plasmas de DECH foram capazes de realçar o potencial imunossupressivo das CTMs, alterando também sua morfologia. Observamos ainda um aumento significativo na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em CTMs expostas ao plasma de pacientes com DECH. Pontualmente, alguns plasmas aumentaram a expressão de transcritos imunorreguladores, como TGF- $\beta$ 1, HGF e GALECTINA-1. Em suma, nossos achados podem servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento da DECH, onde se poderia explorar a própria inflamação promovida pela doença como forma de realçar a capacidade imunossupressiva das células que serão infundidas no paciente.

**Palavras-chave:** Célula-tronco mesenquimal, imunossupressão, DECH, licenciamento.

## ABSTRACT

**CARVALHO, Amandda Évelin Silva de. INFLUENCE OF PLASMA FROM PATIENTS WITH GRAFT VERSUS HOST DISEASE OVER THE IMMUNOSUPPRESSIVE POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS. Brasília, 2018. Dissertation (Master's Degree in Molecular Pathology) - Faculty of Medicine, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.**

Mesenchymal stem-cells (MSCs) have been gaining prominence as an important tool in cell therapy due to its innumerable biological characteristics, associated to ease of obtaining and "*in vitro*" expansion. Among their properties, the most attractive one is the ability to interact and modulate the immune system. The most expressive results of MSCs immunoregulatory potential have been observed in the management and treatment of Graft versus Host Disease (GvHD). This disease is characterized by a systemic inflammatory process mediated by donor T cells that react against receptor antigens, resulting in damage to several organs and tissues. However, in this scenario, a high number of MSCs is necessary to achieve the therapeutic effect and not all patients are benefited from such therapy. Moreover, there is a constant search for strategies that can enhance the properties of these cells. In the present study we established an innovative licensing strategy by subjecting the MSCs to the plasma of patients with acute and chronic GvHD and investigating the impacts of this strategy on MSCs biological properties. In general, the plasmas of GvHD patients showed a higher concentration of the TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and IL-15 cytokines when compared to plasma from healthy donors. In addition, the cGvHD plasmas presented a higher concentration of IL-10 in relation to the aGvHD plasmas. Some plasmas of GvHD were able to highlight the suppressive potential of MSCs, also altering their morphology. We also observed a significant increase in the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in MSCs exposed to plasma from patients with GvHD. Singly, some plasmas increased the expression of immunoregulatory transcripts, such as TGF- $\beta$ 1, HGF and GALECTIN-1. Taken together, our findings may serve as a basis for the development of new therapeutic strategies for the treatment of GvHD, where inflammation promoted by the disease is explored as a tool to enhance the immunosuppressive capacity of the cells that will be infused in the patient.

**Keywords:** Mesenchymal stem-cell, immunosuppression, GvHD, licensing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Interações entre as CTMs e as células do sistema Imune in vitro.....	19
<b>Figura 2:</b> Fisiopatologia da DECHa.. .....	21
<b>Figura 3:</b> Perfil fenotípico das CTMs. ....	34
<b>Figura 4:</b> Dosagem de Citocinas. ....	35
<b>Figura 5:</b> Análise da Viabilidade/Proliferação Celular.....	38
<b>Figura 6:</b> Co-cultivo de CMSP com CTMs.....	39
<b>Figura 7:</b> Alterações Morfológicas das CTMs:.....	40
<b>Figura 8:</b> Expressão de ICAM-1 e VCAM-1.. .....	41
<b>Figura 9:</b> Geração de células T regulatórias.....	42
<b>Figura 10:</b> Perfil Transcricional das CTMs.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados dos pacientes. ....	37
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  = micrograma

$\mu\text{L}$  = microlitro

$\mu\text{M}$  = micromolar

APCs = Células Apresentadoras de Antígeno

CD = do inglês “*Cluster of differentiation*”

cDNA = DNA complementar

CFSE = do inglês “*carboxyfluorescein succinimidyl ester*”

CMSP = Células Mononucleares do Sangue Periférico

$\text{CO}_2$  = Dióxido de Carbono

COX = Ciclo-oxigenase

CTH = Célula-tronco Hematopoiética

CTMs = Células-tronco Mesenquimais

DECH = Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

DECHa = Doença do Enxerto contra o hospedeiro aguda

DECHc = Doença do Enxerto contra o hospedeiro crônica

DMSO = Dimetilsulfóxido

DRM = Doença Residual Mínima

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA = do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”

EVL = Enxerto versus Leucemia

FITC = do inglês “*Fluorescein isothiocyanate*”

GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HGF = do inglês "*Hepatocyte Growth Factor*"

HLA = do inglês "*Human Leukocyte Antigen*"

HPN = Hemoglobinúria Paroxística Noturna

ICAM-1 = do inglês "*Intracellular adhesion molecule-1*"

IDO = Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN- $\gamma$  = Interferon gamma

IL = Interleucina

LLA = Leucemia Linfocítica Aguda

LMA = Leucemia Mielóide Aguda

LMC = Leucemia Mielóide Crônica

LPS = Lipopolissacarídeo

MHC = do inglês "*Major Histocompatibility Complex*"

mM = Milimolar

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

NIH = do inglês "*National Institutes of Health*"

NK = do inglês "*Natural Killer*"

PAMPs = Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS = do inglês "*Phosphate Buffered Saline*"

PCR = do inglês "*Polymerase Chain Reaction*"

PD-1 = do inglês "*Programmed death 1*"

PDL-1 = do inglês "*Programmed death ligand 1*"

PE = Ficoeritrina

PGE2 = Prostaglandina E2

PHA = Fitohemaglutinina

PPP = Plasma Pobre em Plaquetas

RNA = do inglês “*Ribonucleic Acid*”

rpm = rotações por minuto

RTT = Receptor do tipo Toll

SBF = Soro Bovino Fetal

TCTSP = Transplante de células-tronco de sangue periférico

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

Th = do inglês “*T helper*”

TMO = Transplante de medula óssea

TNF = do inglês “*Tumor Necrosis Factor*”

UI = Unidades Internacionais

VCAM-1 = do inglês “*Vascular Adhesion molecule-1*”

x g = Força g

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Células-Tronco Mesenquimais

Identificadas inicialmente na medula óssea como Unidades Formadoras de Fibroblastos (FRIEDENSTEIN et al., 1968), as Células-Tronco Mesenquimais (CTM) são hoje descritas como células progenitoras multipotentes que possuem morfologia fibroblastóide e são capazes de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos (PITTENGER et al., 1999; MO et al., 2016). Sob condições específicas, através de um processo chamado transdiferenciação, tem sido demonstrado que essas células também podem se diferenciar em linhagens não-mesodérmicas como astrócitos (KOPEN et al., 2001) e neurônios (WOODBURY et al., 2000; DENG et al., 2001).

Por não possuírem um marcador específico, a identificação das CTMs é baseada em três critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT): aderência ao plástico; capacidade de se diferenciar *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos; e presença de um painel imunofenotípico específico baseado na ausência de marcadores hematopoiéticos (CD11, CD14, CD34 e CD45) e moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), e na presença de marcadores como CD73, CD90 e CD105 (DOMINICI et al., 2006).

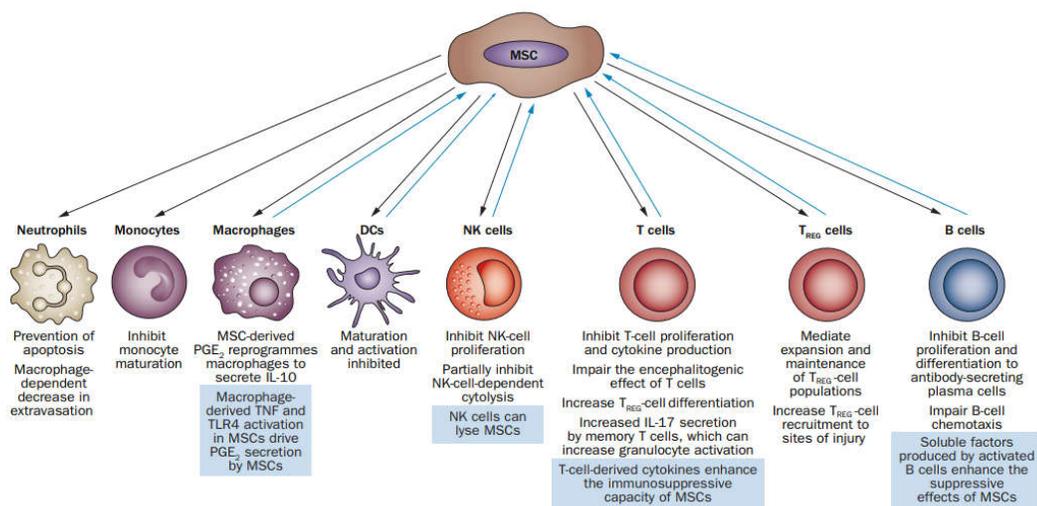
Atualmente, sabe-se que as CTMs podem ser obtidas de praticamente todos os tecidos, tanto em humanos como em camundongos (DA SILVA; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; COVAS et al., 2008). Essa ampla distribuição forneceu indícios de que essas células poderiam exercer diferentes funções biológicas no organismo. De fato, apesar de alguns mecanismos ainda não estarem totalmente elucidados, várias propriedades já foram descritas.

Estudos progressos demonstraram que as CTMs desempenham um papel importante na hematopoiese; regulando a mobilização, *homing* e a manutenção de células-tronco hematopoiéticas primitivas humanas (CTH) (PROCKOP, 1997; CONGET; MINGUEL, 1999; MUGURUMA et al., 2006). Já foi descrito ainda que, sob condições de dano tecidual, as CTMs são recrutadas para os sítios alvo para exercer função de reparo (RIES et al., 2007). Além disso, essas células também desempenham um papel importante no processo de angiogênese (YOO et al., 2012; LOPATINA et al., 2014) e regulação do processo de apoptose sobre algumas células (ROSENBERG et al., 2012; TENG et al., 2015). Entretanto, as características mais intrigantes das CTMs são o escape do reconhecimento imune e a capacidade de modular a resposta imunológica.

Já foi demonstrado que as CTMs conseguem escapar do reconhecimento de células alo-reativas, por apresentarem um caráter pouco imunogênico (BARTHOLOMEW et al., 2002; LE BLANC et al., 2003; MAITRA et al., 2004). De maneira geral, essas células expressam moléculas HLA classe I e não possuem expressão de moléculas HLA classe II, que pode ter sua expressão induzida por exposição dessas células a baixas doses de INF- $\gamma$ . Entretanto, mesmo em condições inflamatórias em que as concentrações de INF- $\gamma$  são elevadas, as CTMs não mostram potencial imunogênico. Esses achados indicam que o escape e a imunomodulação promovida por essas células não se deve à expressão das moléculas de HLA classe I e II (KRAMPERA et al., 2003; POTIAN et al., 2003; RASMUSSEN 2006).

Vários estudos já demonstraram que as CTMs são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T *in vitro*. (DI NICOLA et al., 2002; HOOGDUIJN et al., 2010; LANDGRAF et al., 2011). Os mecanismos pelos quais essa imunomodulação ocorre ainda não estão totalmente elucidados, mas parecem envolver três pontos principais: adesão célula-célula (CTMs – linfócitos), liberação de fatores solúveis e indução de linfócitos T regulatórios (Tregs) clássicos e não clássicos (MACCARIO et al., 2005; PREVOSTO et al., 2007; IANNI et al., 2008). Alguns fatores participativos nesse cenário de imunomodulação dos linfócitos já foram descritos, como adenosina (SALDANHA-ARAÚJO et al., 2011), TGF- $\beta$ 1, HGF (DI NICOLA et al., 2002), PGE2 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; NAJAR et al., 2010), óxido nítrico (NO) (SATO et al., 2007), IL-6 (NAJAR et al., 2009), IDO (MEISEL et al. 2004), dentre outros (SELMANI et al., 2008; YANG et al., 2009; GIESEKE et al., 2010; LEPELLETIER et al., 2010).

As CTMs também interagem com células do sistema imune inato como células dendríticas (DC) e Natural Killer (NK), bloqueando sua diferenciação e diminuindo a citotoxicidade, respectivamente (JIANG et al., 2005; SPAGGIARI et al., 2006; SOTIROPOULOU et al., 2006; RAMASAMY et al., 2007). Elas são ainda capazes de inibir a produção de anticorpos pelos linfócitos B (CORCIONE et al., 2006) e de bloquear a geração e função de células apresentadoras de antígeno (APCs) (HOOGDUIJN et al., 2010) (Figura 1).



**Figura 1: Interações entre as CTMs e as células do sistema Imune *in vitro*.** As CTMs são capazes de interagir com diversas células do sistema imune inato e adquirido, sendo capazes de inibir a proliferação, citotoxicidade e produção de citocinas dessas células. As setas pretas representam os efeitos mediados pelas CTMs, enquanto as setas e as caixas azuis, representam os efeitos das células do sistema imune sobre as CTMs. Obtido de: TYNDALL, 2013.

Embora os fatores solúveis apresentem um papel importante no potencial imunossupressor das CTMs, este efeito se torna mais intenso quando se permite o contato entre as CTMs e os linfócitos (DI NICOLA et al., 2002; TSE et al., 2003; KLYUSHNENKOVA et al., 2005). Já foi demonstrado que em meio inflamatório, as CTMs exibem aumento de expressão de VCAM-1 e de ICAM-1 e passam a recrutar mais linfócitos através do contato célula-célula (GAJEWSKI et al., 2006). VCAM-1, também conhecido como CD106, é capaz de mediar a adesão a linfócitos expressando integrinas alfa-4, e sua expressão está relacionada com um potencial imunossupressor elevado (YANG et al., 2013). Além disso, na presença de linfócitos ativados, as CTMs também promovem a supressão dos linfócitos pela via PD-1/PD-L1 (AUGELLO et al., 2005).

Além da importância do contato célula-célula e da liberação de fatores solúveis, as CTMs são capazes de induzir a diferenciação de células regulatórias clássicas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> (MACCARIO et al., 2005; IANNI et al., 2008) e não clássicas (PREVOSTO et al., 2007; SALDANHA-ARAUJO, 2012). 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, desempenhando um papel importante na regulação dos processos de resposta a infecções (ARPAIA et al., 2015), alergias (BACHER et al., 2016), autoimunidade (OOI et al., 2017) e desenvolvimento de tumores (GRINBERG-BLEYER et al., 2017).

A capacidade das CTMs de interagir e modular o sistema imune tem sido extensivamente explorada e aplicada em uma série de desordens imunológicas (RAFEI et al., 2009; CHO et al., 2009; CHO; ROH, 2010). Nesse contexto, os efeitos mais expressivos têm sido notados no manejo e tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) (LE BLANC et al. 2004, LE BLANC et al., 2008, RINGDEN; LE BLANC, 2011).

## **1.2. Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro**

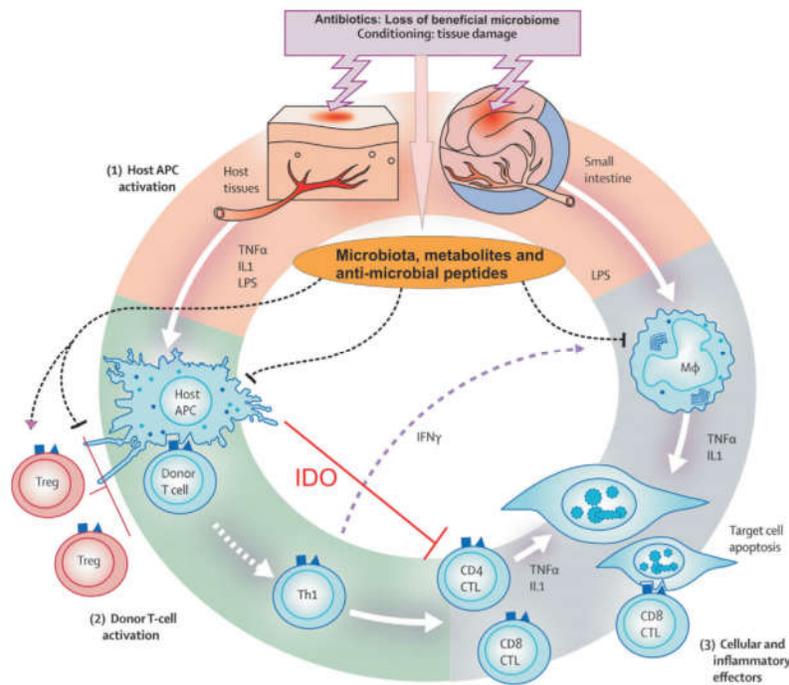
A DECH é a principal complicação clínica decorrente do transplante de medula óssea (TMO) alogênico, afetando em torno de 50% dos pacientes (REDDY et al., 2008; JAGASIA et al., 2012). Essa doença é caracterizada por uma resposta imunológica exacerbada, desencadeada por linfócitos T do doador contra antígenos do receptor, resultando em danos a vários órgãos e tecidos (FERRARA; DEEG, 1991; JACOBSON; VOGELSANG, 2007; CHOI; LEVINE; FERRARA, 2010).

A DECH pode ser dividida em duas fases: aguda (DECHa) e crônica (DECHc). Inicialmente essa classificação fundamentava-se no tempo de aparecimento dos sintomas, onde a DECHa ocorreria entre os 100 primeiros dias pós-transplante e, após esse período, as manifestações apresentadas seriam classificadas como crônicas (FERRARA; REDDY, 2006). Entretanto, devido às divergências encontradas entre estudos clínicos, o NIH desenvolveu um consenso estabelecendo novos critérios para o diagnóstico e classificação da DECH, baseados nas manifestações clínicas e não no intervalo de tempo após o transplante (JAGASIA et al., 2015). Além disso, as duas fases da DECH parecem possuir distinções entre seus mecanismos fisiopatológicos: enquanto a DECHa é resultante da ativação de linfócitos T aloreativos (MORISHIMA et al., 2002), a DECHc parece envolver tanto mecanismos aloreativos, quanto autoreativos (FERRARA et al., 2009).

A DECHa geralmente ocorre nos 3 primeiros meses após o transplante. A pele é o órgão mais acometido, seguido pelo fígado e trato gastrointestinal (TGI) (MARTIN et al., 1900; WELNIAK; BLAZAR; MURPHY, 2007). A sintomatologia clássica é composta por *rash* cutâneo, diarreia e alterações dos níveis de bilirrubina. Com base na intensidade desses sintomas, no número e na extensão dos órgãos afetados, a DECHa pode ser subdividida em 4

graus: Grau I (leve), Grau II (moderado), Grau III (grave) e Grau IV (muito grave) (PRZEPIORKA et al., 1995; BALL; EGELER, 2008).

A fisiopatologia da DECHa pode ser dividida em 3 estágios (Figura 2). O primeiro deles inicia-se no dano tecidual causado pelo regime de condicionamento. A liberação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 pelas APCs do hospedeiro (SHLOMCHIK et al., 1999) causa danos no TGI, permitindo a translocação de produtos bacterianos como o Lipopolissacarídeo (LPS) para a circulação (HILL et al., 1997). A presença desses sinais induz a ativação dos linfócitos T do doador seguido da sua expansão clonal, caracterizando o segundo estágio de amplificação da resposta, que culmina com a tempestade de citocinas resultante das respostas Th1 e Th2 (NIKOLIC et al., 2000). O estágio três, também chamado de fase efetora, é caracterizado pelos danos causados aos tecidos alvo mediado por linfócitos T citotóxicos, células NK e óxido nítrico (WELNIAK; BLAZAR; MURPHY, 2007; GHIMIRE et al., 2017).



**Figura 2: Fisiopatologia da DECHa.** O dano tecidual causado pelo regime de condicionamento causa danos ao TGI induzindo a liberação de citocinas inflamatórias que levam à ativação das células T. A expansão clonal dessas células propaga a inflamação ativando também células T citotóxicas e células NK que causam danos aos tecidos alvos da DECH. Obtido de: GHIMIRE et al., 2017.

Estudos mostram que a intensidade das manifestações da DECHa envolve mecanismos relacionados à liberação de citocinas inflamatórias (REDDY, 2003; MOHTY et al., 2005), ao

grau de incompatibilidade entre as moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) (MORISHIMA et al., 2002) e à intensidade do regime de condicionamento (FERRARA et al., 2009). O regime de condicionamento também parece impactar a ativação do inflamassoma, desencadeando a síntese de pró-IL-1 $\beta$ , que por sua vez está envolvida no desenvolvimento e severidade da DECH aguda (JANKOVIC et al., 2013).

A DECHc possui características que se assemelham às doenças autoimunes do colágeno e a outras complicações imunológicas, podendo ser restritas a um único órgão ou difundidas pelo corpo (JAGASIA et al., 2015). Essa patologia afeta 30-65% dos pacientes e permanece sendo a maior causa de morte não relacionada à recidiva relatada após o transplante alogênico de CTH (LEE et al., 2002; BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012). A DECHc pode manifestar-se de forma progressiva, quiescente ou sem histórico prévio de DECHa (de novo). Pode ainda ser subclassificada como leve, moderada ou severa, com base no grau de comprometimento dos órgãos afetados (JAGASIA et al., 2015). Embora existam muitos estudos acerca da DECHc, sua fisiopatologia ainda não é totalmente elucidada, uma vez que os modelos experimentais utilizados não são capazes de mimetizar todas as características e a cinética envolvidas nessa fase da doença (SCHROEDER; DIPERSIO, 2011).

Sabe-se hoje que as citocinas desempenham um papel importante no curso clínico da DECH, tanto na amplificação da resposta quanto no dano tecidual (WELNIAK, BLAZAR, MURPHY, 2007). Além disso, também contribuem para o efeito enxerto-versus-leucemia (EVL) (YANG, 2002). Diversos trabalhos têm investigado os níveis de citocinas no soro de pacientes com DECH e sua associação como um biomarcador da doença (PACZESNY et al; 2009; HENDEN; HILL, 2015; BUDDE et al., 2017).

A participação das citocinas impacta diretamente a maturação e a proporção das respostas Th1e Th2 envolvidas na DECH (HENDEN; HILL, 2015). Dentre elas, o TNF- $\alpha$  tem sido relatado como um importante fator participativo na indução e manutenção da doença (FERRARA; LEVI; CHAO, 1999; REDDY, 2003; MOHTY et al., 2005; LEVINE, 2011). Pertencente à família de citocinas inflamatórias do tipo I, o TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante na ativação das APCs do hospedeiro, na amplificação do dano ao TGI resultando na propagação da tempestade de citocinas (HILL; FERRARA, 2000) e também exercendo atividade sinergista na destruição dos tecidos alvo (WELNIAK, BLAZAR, MURPHY, 2007). Nesse contexto o INF- $\gamma$ , outra citocina gerada durante a diferenciação da resposta Th1 (HILL; FERRARA, 2000), parece exercer efeitos similares ao TNF- $\alpha$  (ELLISON et al., 2003; BURMAN et al., 2007). Entretanto, há resultados conflitantes quando aos seus efeitos na DECH

(WANG et al., 2009; WANG; YANG, 2014), pois alguns estudos relatam que além de ser um fator protetivo no desenvolvimento da doença, o INF- $\gamma$  também contribui para o efeito EVL (ASAVAROENGCHAI et al., 2007; BURMAN et al., 2007; WANG; YANG, 2014).

Estudos em modelo murino também têm relatado a importância da IL-12 e da IL-23 na DECH (WU et al., 2015). Essas duas citocinas possuem uma subunidade em comum chamada p40 e estão relacionadas com diferenciação do fenótipo Th1 e na manutenção da resposta Th17 (VIGNALI; KUCHROO, 2012). A subunidade IL-12p40 parece estar relacionada com a migração de células T para os tecidos alvo (KICHIAN et al., 1996), uma vez que seu bloqueio foi capaz de diminuir significativamente a expressão de CXCR3, uma quimiocina responsável pela migração de células Th1 (STILES et al., 2006; NAKAJIMA et al., 2007) e de atenuar o desenvolvimento da DECHc (OKAMOTO et al., 2014).

O contexto no qual as citocinas estão inseridas interferem diretamente no seu efeito, é o que tem sido observado com a IL-10. A IL-10 é um fator anti-inflamatório produzido durante a resposta Th2. Estudos *in vitro* tem demonstrado que altas doses de IL-10 estão relacionadas com redução da severidade da DECH. Em contrapartida, doses elevadas de IL-10 aceleram o desenvolvimento da DECH em modelo murino (BLAZAR et al., 1995; LIN et al., 2003). Há evidências que apontam que a IL-15 também está relacionada com o desenvolvimento da DECHa, sugerindo seu papel na ativação e sobrevivência de células T CD8 alo reativas (BLASER et al., 2005).

Apesar das inúmeras intervenções terapêuticas e profiláticas, a DECH ainda leva de 15-30% dos pacientes a óbito, o que acaba sendo um fator limitante do TMO (PASQUINI et al., 2010). Os glicocorticoides permanecem sendo a primeira linha de tratamento, apesar dos relatos de resistência e de susceptibilidade a infecções (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012). As medidas alternativas disponíveis envolvem a fotofereze extracorpórea (GREINIX et al., 2000), a globulina anti-timocítica (KHOURY et al., 2001) e anticorpos monoclonais, porém, sua influência no prognóstico desses pacientes permanece insatisfatória (WOLFF et al., 2011).

Nesse contexto, vários estudos já demonstraram o efeito positivo da infusão das CTMs em pacientes com DECH (LE BLANC et al. 2004; FANG et al., 2007; RINGDEN; LE BLANC, 2011), mesmo em pacientes resistentes a corticoides (LE BLANC et al., 2008). Baseado nas propriedades imunológicas das CTMs, foi desenvolvido o primeiro medicamento a base de células, o PROCHYMAL (Osiris Therapeutics Inc). Apesar de promissor, já foram relatadas algumas complicações decorrentes da sua administração. Devido à alta taxa de retenção em

órgãos como pulmão e a baixa resistência celular, são necessárias altas quantidades de células para obter o efeito terapêutico desejado (LAMOURY et al., 2011). Essa massa de células pode favorecer a formação de agregados celulares que pode resultar em embolia pulmonar ou infartos (PROCKOP; OLSON, 2007). Além disso, os resultados obtidos são heterogêneos e não são todos os pacientes que se beneficiam com o 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 (reposta 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).

Ademais, para gerar uma quantidade suficiente de células para a aplicação clínica é necessário um longo processo de expansão. Com isso, algumas propriedades das CTMs podem ser gradualmente reduzidas pelo tempo em cultura e repetidas passagens, levando essas células a entrarem num processo de senescência e, conseqüentemente, reduzindo seu potencial para fins terapêuticos (KRETLOW et al., 2008).

Como pode ser visto, é de fundamental importância para o campo da terapia celular a busca por mecanismos que amplifiquem o potencial das CTMs. Nesse contexto, o licenciamento dessas células com fatores inflamatórios tem demonstrado resultados promissores, haja vista que as propriedades imunorregulatórias das CTMs não são constitutivas, sendo necessário ativá-las para desempenharem tal função (KRAMPERA, 2011).

### **1.3. Licenciamento**

A ativação das CTMs, também chamada de licenciamento, pode ocorrer pela presença de citocinas inflamatórias como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que são capazes de aumentar a capacidade supressora dessas células (ENGLISH et al., 2007; RYAN et al., 2007; KRAMPERA, 2011). Foi demonstrado em um modelo murino, que a eficácia terapêutica das CTMs no tratamento da DECH é dependente dos níveis de INF- $\gamma$ , 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 desejado. Outro fato importante demonstrado nesse estudo foi que o tratamento da DECH com uso de CTMs ativadas, ao contrário dos demais estudos da literatura em que se utilizava CTMs não tratadas, assegurou resultados homogêneos, e manteve a sobrevivência de todos os camundongos transplantados (POLCHERT et al., 2008).

Além das propriedades imunorreguladoras, a capacidade de migração para os sítios inflamatórios também é essencial para que as CTMs consigam exercer seus efeitos nos locais de enxertia. Estudos prévios demonstraram que o licenciamento das CTMs com IL-1 $\beta$  é capaz de realçar seu potencial imunorregulador aumentando a expressão de moléculas de adesão, facilitando e realçando seu potencial migratório para os sítios alvo, além da produção de quimiocinas e citocinas que influenciam no recrutamento de outras células do sistema imune (CARRERO et al., 2012; FAN et al., 2012).

Outra citocina inflamatória, a IL-17, também parece influenciar nas propriedades das CTMs. Diversos estudos já demonstraram que essa citocina é capaz de realçar a capacidade imunossupressora das CTMs (HAN et al., 2014; MA et al., 2018) sem alterar seu potencial imunogênico (SIVANATHAN et al., 2015). Além disso, o tratamento dessas células com IL-17 gera aumento da produção de Tregs e de citocinas envolvidas na supressão de linfócitos T (HAN et al., 2014; SIVANATHAN et al., 2015).

Ainda no que diz respeito ao licenciamento, a sinalização dos Receptores Tipo Toll (RTT) também parece influenciar o comportamento das CTMs. Já foi descrito que as CTMs expressam a nível proteico os RTT 2,3,4,7 e 9 (DELAROSA; LOMBARDO, 2010). Dentre esses, os RTT3 e RTT4 parecem estar relacionados com a polarização das CTMs em dois fenótipos diferentes: CTM1 e CTM2, sendo classificados como pró- e anti-inflamatório, respectivamente (WATERMAN et al., 2010).

Como pode ser visto, existe grande esforço da comunidade científica para buscar alternativas que realcem o potencial supressivo das CTMs (HU; LI, 2018). Apesar do licenciamento dessas células com INF- $\gamma$  mostrar benefício em modelo murino, esse achado não tem se reproduzido em células humanas (CHINNADURAI et al., 2014; TADDIO et al., 2015). Além disso, é muito simplista atribuir somente ao INF- $\gamma$  o papel de licenciar as CTMs, uma vez que a combinação de citocinas pró-inflamatórias parece promover um efeito imunomodulador ainda mais eficiente quando comparado a presença de citocinas isoladas (REN et al., 2010; HAN et al., 2014).

Tendo em vista a vasta gama de citocinas inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da DECH (HENDEN; HILL, 2015), pretendemos com esse estudo desenvolver uma estratégia inovadora, promovendo licenciamento das CTMs ao expor essas células ao plasma de pacientes com DECHa e DECHc. Os resultados obtidos poderão ter um impacto direto no

desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da DECH, na qual se utiliza a inflamação do próprio paciente como ferramenta para realçar o potencial das CTMs.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

- Avaliar a influência do plasma de pacientes com DECH sobre o potencial imunossupressor das CTMs.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar fenotipicamente as CTMs de tecido adiposo;
- Caracterizar o perfil de citocinas do plasma de pacientes com DECH;
- Avaliar o efeito do plasma de pacientes com DECH sobre a proliferação das CTMs;
- Avaliar o efeito do plasma de pacientes com DECH sobre o potencial supressivo das CTMs;
- Avaliar o efeito do plasma de pacientes com DECH sobre a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 das CTMs;
- Avaliar o efeito do plasma de pacientes com DECH sobre a capacidade das CTM em induzir a geração de células T regulatórias;
- Avaliar o perfil de expressão gênica das CTMs licenciadas com plasma de pacientes com DECH.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção das CTMs**

Nesse projeto foram utilizadas 3 amostras de CTMs de tecido adiposo humano, fornecidas pela empresa *Cellseq solutions*.

#### **3.2. Coleta dos plasmas de pacientes com DECH**

Após terem sido esclarecidos sobre a pesquisa e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os pacientes foram submetidos à coleta de sangue periférico a vácuo em tubos contendo anticoagulante EDTA.

Os plasmas de pacientes com DECH aguda (n=7) (GVA) e/ou crônica (n=12) (GVC) foram coletados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e no Instituto de Cardiologia do Distrito Federal, na Unidade Pietro Albuquerque. Extraímos ainda do prontuário desses pacientes, informações referentes à idade, sexo, doença de base, medida terapêutica, classificação e grau da DECH, órgãos afetados e medicações em uso.

Foram coletados também plasmas de indivíduos hematologicamente saudáveis (n=8) na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, os quais foram agrupados em um pool, de modo a compor a amostra “pool controle”.

O uso científico dos plasmas foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição proponente e das Instituições coparticipantes (projeto: “Efeito de fatores inflamatórios sobre a propriedade imunossupressora das células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea e placenta.” CAAE: 35640514.5.0000.0030).

#### **3.3. Preparo do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)**

Para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP), as amostras passaram por um processo duplo de centrifugação. Primeiramente, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 minutos para separação inicial da parte celular e do plasma. O plasma foi então coletado e acondicionado em microtubos de 1,5mL previamente identificados. Posteriormente, os plasmas passaram pelo segundo ciclo de centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos. Findado esse processo, foram coletados 2/3 do sobrenadante (PPP) e acondicionado em novos microtubos.

Para evitar possível solidificação do meio de cultura, os PPPs foram tratados com 2UI/mL de Heparina sódica. Essas amostras foram armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios propostos.

### **3.4. Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)**

As CTMs foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75cm<sup>2</sup> (Falcon; Franklin Lakes, NJ) em meio alfa-mínimo essencial (alpha-MEM, Minimum Essential Medium) suplementado com 100 µg/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 2mM L-glutamina e 15% de Soro Bovino Fetal (SBF). Após o período de expansão, as células foram colhidas por tripsinização utilizando uma solução 0,2% tripsina-EDTA e utilizadas nos experimentos propostos. Para todos os experimentos, foram utilizadas CTMs em triplicata em 4-6 passagem.

### **3.5. 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), conforme as orientações do fabricante.

Avaliamos se a exposição dessas células aos plasmas influenciaria no seu perfil fenotípico. Para isso, agrupamos as amostras dos pacientes com DECHa e DECHc de forma a compor dois pools. As CTMs foram cultivadas em meio alfa-mínimo essencial suplementado com 100 µg/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 2mM L-glutamina e 15% do pool de DECHa, 15% do pool de DECHc e comparadas com CTMs tratadas com 15% do pool controle. As células permaneceram em contato com os respectivos tratamentos por 24 horas. Findado esse período, as células foram tripsinizadas e separadas para imunofenotipagem com os marcadores positivos (CD44, CD73, CD90 e CD105) e negativos (CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR).

O experimento foi analisado no citômetro de fluxo FACSVerse no Instituto de Biologia-UnB. A análise dos dados foi feita por uso do software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

### **3.6. Caracterização do perfil de citocinas do Plasma dos Pacientes com DECH**

Para caracterizar o perfil de citocinas presente nos plasmas foi realizado um ensaio de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), conforme instruções do fabricante (ImmunoTools). O ensaio foi realizado em duplicata e as citocinas avaliadas foram TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12p40 e IL-15. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450nm na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter), sendo a absorbância diretamente proporcional à concentração das citocinas.

### **3.7. Licenciamento das CTMs com plasma de pacientes com DECH**

Como estratégia de licenciamento, as CTMs de tecido adiposo foram cultivadas por 24 horas em meio suplementado com 15% de plasma de DECH, enquanto as CTMs controles foram mantidas em meio suplementado com 15% do pool controle. Após esse período, as CTMs foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e utilizadas para os ensaios propostos.

### **3.8. Ensaio de Viabilidade/Proliferação Celular**

A proliferação/viabilidade das CTMs foi avaliada por ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolim]}. Nesse ensaio avaliamos se os plasmas de pacientes com DECH poderiam influenciar a viabilidade/proliferação das CTMs. Em suma foram plaqueadas  $4 \times 10^3$  CTMs em placa de 96 poços contendo 100  $\mu$ l de meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de plasma com DECH e, como controle, CTMs tratadas com 15% do pool controle. As CTMs foram licenciadas por 24h. Findado esse período, o meio de cultivo foi removido da placa, os poços lavados 3 vezes com tampão PBS, um novo meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de SBF foi adicionado ao cultivo celular e a placa foi mantida em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, sendo a viabilidade/proliferação analisada nos dias 1, 3 e 5 posteriores ao licenciamento.

Nos dias de leitura, as células foram tratadas por 4h com 5mg/mL de MTT. Durante esse período, as placas foram envolvidas em papel alumínio e mantidas em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, o meio de cultura foi gentilmente removido e foram adicionados 100 $\mu$ L de DMSO em cada um dos poços. A placa foi mantida em bandeja agitadora por 15 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) no comprimento de onda de 570nm.

### **3.9. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) e marcação com CFSE**

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.

Em suma, tubos cônicos de 15 ml foram preenchidos com 3 ml de Ficoll, 4 ml de sangue total e 4 ml de tampão PBS, estando todos os reagentes em temperatura ambiente. Os tubos cônicos foram centrifugados a 360xg por 25 minutos. Após esse período, 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 tampão PBS. Por fim, o pellet celular obtido das lavagens foi ressuspenso em 1 ml de meio RPMI suplementado com 10% de SBF e foi realizada a contagem celular com o auxílio da Câmara de Neubauer.

Para viabilizar a análise de proliferação, as CMSP foram marcadas com 2,5  $\mu$ M/mL de *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE, Sigma Aldrich). Para isso, as células com CFSE foram incubadas por 7,5 minutos a 37° C em banho-maria e, após esse período, a marcação foi interrompida com 10mL de RPMI gelado contendo 10% de SBF, mantendo-se a amostra refrigerada por 5 minutos. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens com tampão PBS, utilizando centrifugação de 1.200 rpm por 10 minutos.

Por fim, o pellet celular obtido das lavagens foi ressuspenso em 1 ml de meio RPMI suplementado com 10% de SBF. Essas células foram contadas com o auxílio da Câmara de Neubauer e utilizadas para o ensaio de imunossupressão, como detalhado a seguir.

### **3.10. Ensaio de Imunossupressão**

Para analisar o efeito do licenciamento das CTMs com plasma de DECH sobre a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T, utilizamos um modelo de co-cultivo celular. Para isso,  $3 \times 10^4$  CTMs foram plaqueadas e licenciadas por 24 horas em placas de 96 poços contendo 100  $\mu$ l de meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de plasma de DECH e as CTMs controles foram mantidas em meio sem SBF suplementado com 15% do pool controle. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, os poços foram lavados 3 vezes com tampão PBS e adicionado meio RPMI com 10% de SBF. Em seguida, adicionou-se  $3 \times 10^5$  CMSP previamente marcadas com CFSE e ativadas com 5  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina (PHA). Ao quinto dia do experimento as CMSP foram recolhidas, transferidas para microtubos

previamente identificados e centrifugadas para obtenção do pellet celular, que foi ressuspendido 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 ressuspendidas em 300µL de PBS e a proliferação celular foi analisada no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB. A análise dos dados foi feita com o auxílio do software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

### **3.11. Expressão de moléculas de Adesão ICAM-1 e VCAM-1**

A avaliação da influência dos plasmas de DECH na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em CTMs foi realizada por Citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos anti CD-54 conjugado a APC e anti CD-106 conjugado a FITC, respectivamente.

Para isso,  $1,5 \times 10^5$  CTMs foram plaqueadas em placas de 12 poços e licenciadas por 24 horas em meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de plasma de DECH e as CTMs controles foram mantidas em meio suplementado com 15% de pool controle. Após as 24 horas, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com tampão PBS e as células foram recolhidas por tripsinização e acondicionadas em microtubos devidamente identificados. As amostras foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e ressuspendidas em 300µL de PBS e analisadas no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

### **3.12. Geração de linfócitos T regulatórios**

Para analisar o efeito do licenciamento das CTMs com plasma de DECH sobre a capacidade de induzir a geração de células T regulatórias, utilizamos um ensaio de co-cultivo celular. Para isso,  $3 \times 10^4$  CTMs foram plaqueadas e licenciadas por 24 horas em placas de 96 poços em 100 µl de meio alfa-mínimo essencial suplementado com 15% de plasma de DECH e as CTMs controles foram mantidas em meio suplementado com 15% do pool controle. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, os poços foram lavados 3 vezes com tampão PBS e adicionado RPMI com 10% de SBF. Em seguida, adicionou-se  $3 \times 10^5$  CMSP ativadas com 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). A placa foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 dias. Ao quinto dia do experimento as CMSP foram recolhidas, transferidas para microtubos previamente identificados e centrifugadas para obtenção do pellet celular. Para marcação das células T regulatórias, utilizamos o kit *Anti-Human FoxP3 Staining Kit* (BD Bioscience), conforme instruções do fabricante.

Em seguida as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 300 $\mu$ L de PBS e a expressão das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foi analisada no Citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB. A análise dos dados foi feita por uso do software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

### 3.13. PCR em tempo real

O perfil de expressão de genes relacionados à resposta imune foi avaliado pela metodologia de PCR em tempo real. Para esse ensaio utilizamos CTMs licenciadas por 24 horas em meio isento de SBF e suplementado com 15% de plasma de DECH, enquanto as CTMs controles foram mantidas em meio suplementado com 15% do pool controle. Após o período de licenciamento, o meio foi removido, as CTMs foram lavadas e 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 *NanoVue Plus* (GE Healthcare). 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 GAPDH, 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 (Hs00984148), Galectina-1 (Hs00355202), TGF- $\beta$ 1 (Hs00998133) e IL-10 (Hs00961622) utilizando TaqMan Master Mix (Thermo Fisher) no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (ThermoFisher). No mesmo equipamento analisamos pela metodologia de SYBR Green a expressão dos genes COX2 e HGF. Os primers usados tiveram as seguintes sequências: COX 2 F-GAAGTTGGCAGCAAATTGAGC e R-TTCTCCTGTGAAGGCGATGA, HGF F-CATGCTGGCCCTTACCTAGC e R-GAGGAGAGGACCAAGTTCACA.

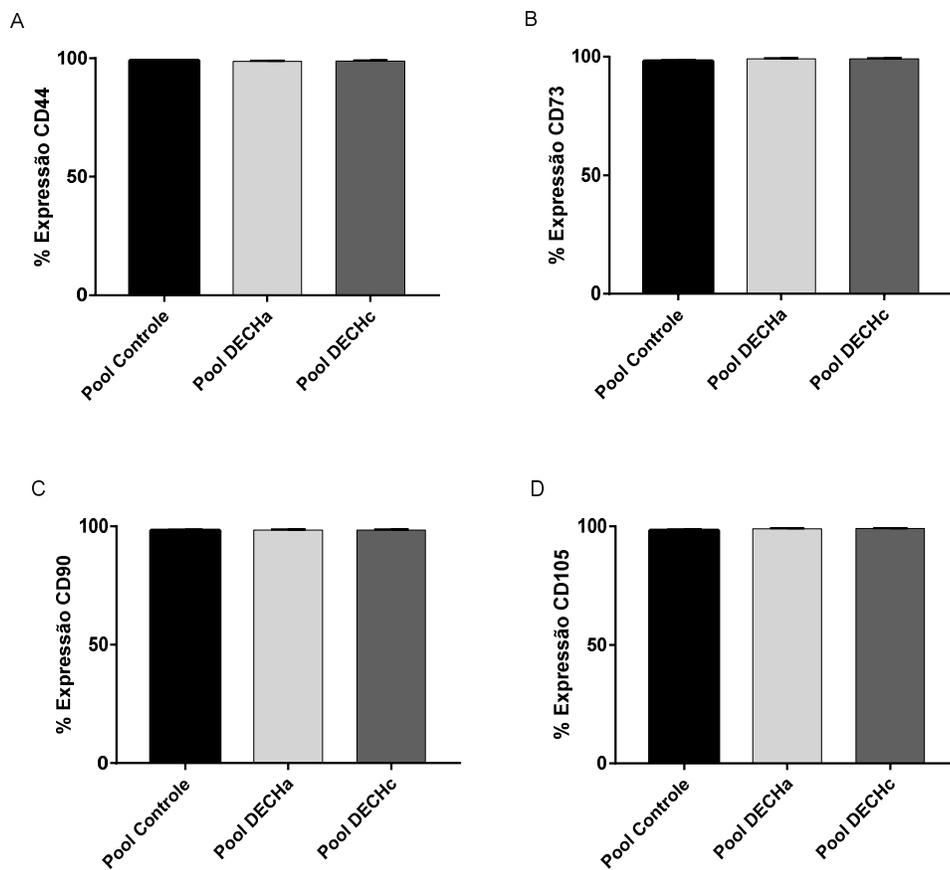
### 3.14. Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o *software Prism 7* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). As comparações entre os grupos independentes foram realizadas através do teste *t* de Student em relação ao grupo controle. Os resultados foram expressos como Média $\pm$ DP. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil Fenotípico das CTMs de Tecido Adiposo

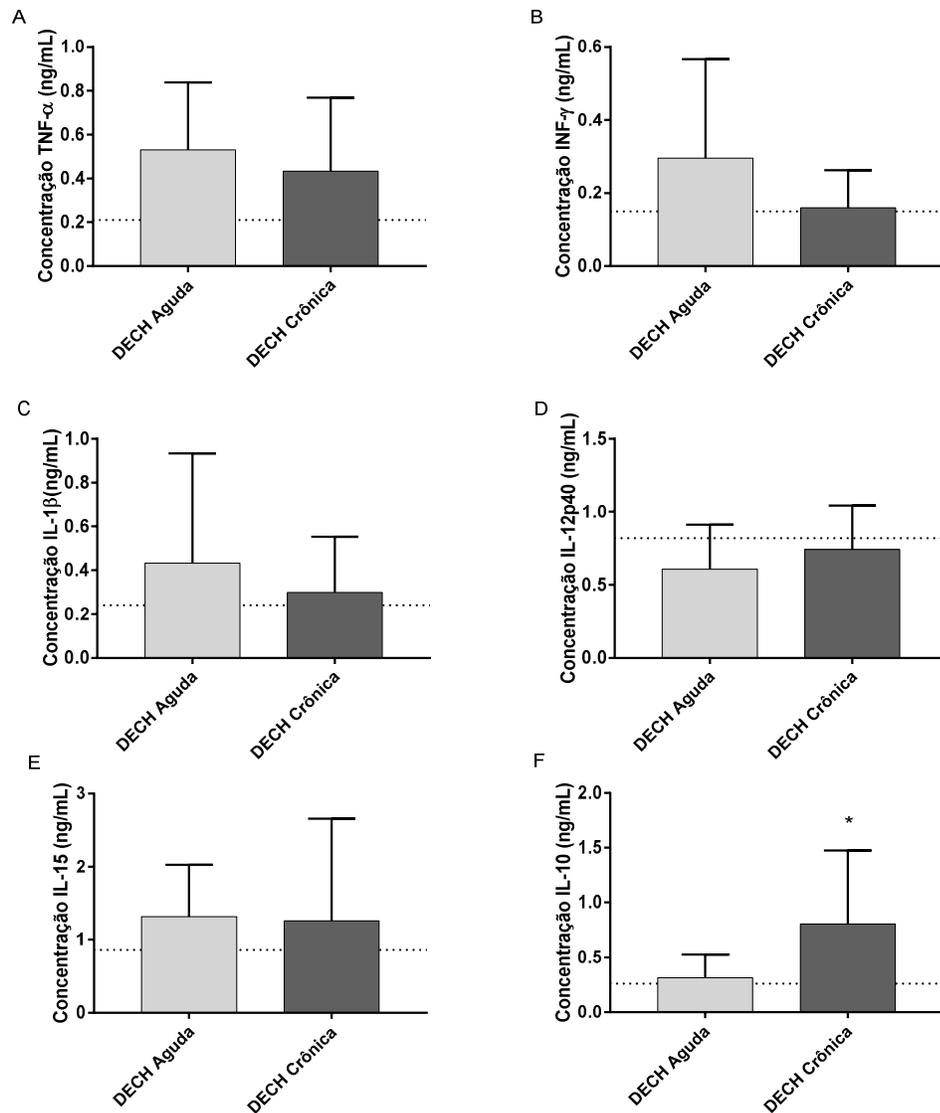
As CTMs de tecido adiposo utilizadas nesse estudo apresentaram perfil fenotípico clássico de CTMs, mostrando alta positividade para os marcadores CD44 (99,1%), CD73 (98,2%), CD90 (98,2%) e CD105 (98,4%). Mesmo sob influência dos plasmas de DECHa e DECHc, não houve alterações significativas no seu fenótipo clássico (Figura 3).



**Figura 3: Perfil fenotípico das CTMs.** Os gráficos mostram a expressão dos marcadores CD44, CD73, CD90 e CD105 em uma das CTMs utilizadas no estudo.

## 4.2. Caracterização dos plasmas

Os Plasmas de DECH apresentaram constituição heterogênea no que diz respeito à dosagem de citocinas. Os plasmas de DECH foram separados quanto a sua classificação em agudos e crônicos (Figura 4). De maneira geral, os plasmas de DECH apresentaram maior concentração de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-15 em relação ao Pool controle. Em contrapartida, o Pool controle apresentou uma concentração mais elevada de IL12p40 em relação aos demais grupos (Figura 4d). O pool de plasma de DECHc apresentou um aumento significativo de IL-10 em relação ao pool de DECH aguda ( $p=0,03$ ) (Figura 4f).



**Figura 4: Dosagem de Citocinas em plasmas de DECH.** O perfil de Citocinas foi caracterizado por ELISA, sendo o resultado expresso em ng/mL. As barras representam a média $\pm$ DP da concentração das citocinas (A) TNF- $\alpha$ , (B) INF- $\gamma$ , (C) IL-1 $\beta$ , (D) IL-12p40, (E) IL-15 e (F) IL-10. A linha pontilhada representa a dosagem realizada no pool controle. \* significa  $p<0,05$ .

### **4.3. Dados Clínicos dos Pacientes com DECH**

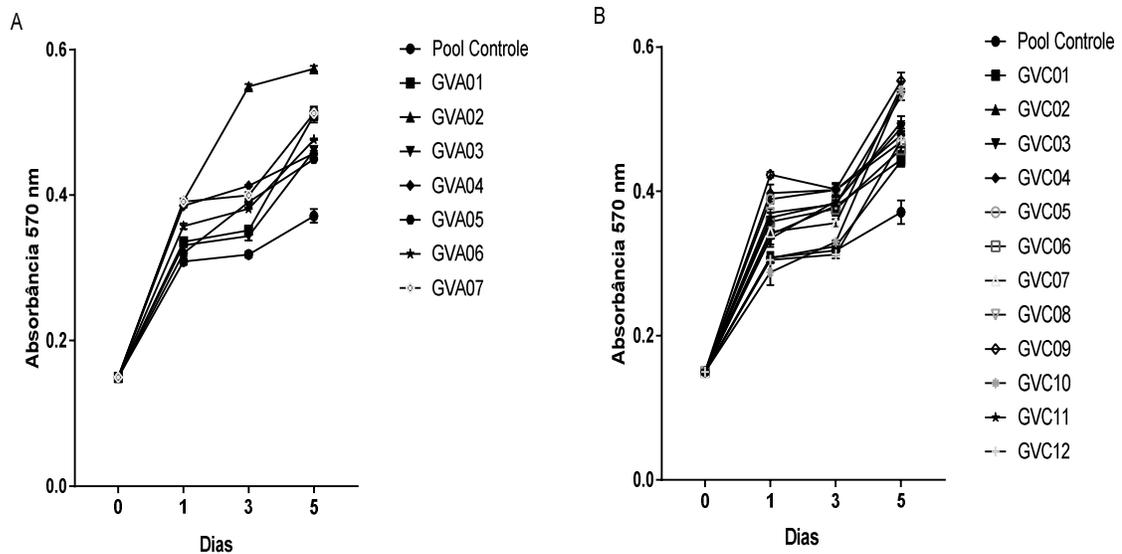
Foram extraídas informações dos prontuários dos pacientes com DECHa (n=7) e DECHc (n=12) atendidos nos centros clínicos colaboradores (Tabela 1). A mediana de idade apresentada foi de 36 anos, variando de 12 a 70 anos. Dos 19 pacientes incluídos no estudo, 63,1% eram do sexo masculino e 36,9% do sexo feminino. Entre as doenças de base, a mais prevalente foi a LLA (26,3%), seguida pela LMA (21%), LMC (21%), Anemia Aplástica (15,8%), LA bifenotípica (10,5%) e Mielofibrose (5,2%). Quanto à medida terapêutica utilizada, 13 pacientes (68,4%) foram submetidos ao TMO e 6 pacientes (31,6%) receberam o TCTSP alogênico. Os órgãos mais afetados pela DECH foram a pele (52,6%), fígado (31,6%), TGI (31,6%), boca (26,3%), olhos (21%) e pulmão (5,2%).

Paciente	Idade	Sexo	Doença de Base	Medida Terapêutica	DECH	Órgão Afetado	Grau DECH	Medicações em Uso
GVA01	14	M	Anemia Aplástica	TMO	Agudo	Pele	I	Sirolimus 1mg, Micofenolato de Mofetila 720 mg, Prednisona 20mg, Dextroclorfeniramina 2mg, Fluconazol 300 mg, Aciclovir 400 mg, Bactrim, Omeprazol 40 mg, Óxido de Magnésio 416 mg, Ácido Fólico 5mg
GVA02	10	F	LLA	TMO	Agudo	Pele	III	Sirolimus 0,4mg, Metilprednisolona 10mg, Óxido de Magnésio 416mg, Micofenolato de Mofetila 500mg, Voriconazol 200mg, Lamotrigina 50mg, Ácido fólico 5mg, Filgrastima 300mg, Omeprazol 40g, Aciclovir 250mg
GVA03	44	F	Anemia Aplástica	TMO	Agudo	Boca, olhos	I	Omeprazol, Lamotrigina, Ácido Fólico, Aciclovir
GVA04	30	F	LLA B	TMO HAPLO AP	Agudo	Pele, fígado	I	Sirolimus 1mg, Aciclovir 200mg, Voriconazol 200mg, Dapsona 100mg, Pantoprazol 40mg, Sertralina 50mg, Prednisona 30mg, Alendronato 70mg, Vitamina D, Carbonato de Cálcio
GVA05	19	M	LLA	TMO HAPLO AP	Agudo	Pele, TGI	?	Prednisona 80mg, Dapsona 100mg, Fluconazol 400mg, Aciclovir 400mg, Ácido Fólico 5mg, Clonazepam, Omeprazol 20mg, Carbonato de Cálcio 500mg, Vitamina D, Sertralina 50mg
GVA06	21	M	Anemia Aplástica + Clone HPN	TMO	Agudo	Pele, Fígado, TGI	IV	Prednisona 10mg, Micofenolato de Mofetila 1000mg, Bactrim, Fluconazol 200mg, Ácido Fólico 5mg, Omeprazol 20 mg
GVA07	12	M	LLA B	TMO NAP	Agudo	Pele	III	Bactrim, Fluconazol, Aciclovir e Ciclosporina 100 mg
GVC01	26	M	LA bifenotípica DRM+	TMO ALO NAP 10/10	Crônica	Pulmão	-	Nenhuma
GVC02	36	M	LMC	TMO ALO AP 8/8	Crônica	Olhos	-	Omeprazol 20mg, Ursacol, Aciclovir 400mg, Bactrim 400mg, Sinvastatina 20mg, Arletac e Epitegel
GVC03	52	F	LMA com maturação	TCTSP ALO AP	Crônica	Boca, Olhos e Fígado	-	Ciclosporina 100mg, Prednisona (desmame), Aciclovir, Bactrim, Omeprazol, Ursacol, Artelac, Liposic, Anlodipino, Decadron
GVC04	41	F	LA bifenotípica DRM+	TCTSP ALO AP	Crônica	Pele e Boca	-	Ciclosporina 100mg, Omeprazol 40mg, Bactrim, Aciclovir, Ciprofibrato 100mg, Dexam bochecho, Ac fólico, citoneurim
GVC05	50	F	LMC	TMO ALO AP	Crônica	Olhos e Boca	-	Ciclosporina 75mg, Aciclovir 200mg, Bactrim 400/80mg, Ursacol 300mg, Omeprazol 20mg, Decadron
GVC06	43	M	LMC	TCTSP ALO AP 6/6	Crônica	Fígado e TGI	-	Prednisona, Aciclovir, Omeprazol, Ciclosporina 100mg, Anlodipino, Ursacol
GVC07	12	M	LLA recidivada	TMO NAP	Crônica	Boca e TGI	-	Nenhuma
GVC08	24	F	LMA com maturação	TCTSP ALO NAP 9/10 A	Crônica	Fígado	-	Nenhuma
GVC09	70	M	LMA alto risco	TMO ALO AP 8/8	Crônica	Pele	-	Ciclosporina 100+100mg, Aciclovir, Bactrim, Ursacol, Omeprazol 20mg
GVC10	69	M	LMA alto risco	TMO ALO AP 8/8	Crônica	Pele	-	Ciclosporina 50mg, Ursacol, Aciclovir, Omeprazol, Doxazosin 4mg, Bactrim
GVC11	61	M	Mielofibrose 1ª	TCTSP ALO AP 10/10	Overlap?	Pele G3; FIG I; TGI I	-	Ciclosporina 250mg, Bactrim 400mg, Ursacol 300mg, Aciclovir 400mg, Carbo Mg 250mg, Selozok 50mg, Hidroclorotiazida 25mg, Anlodipino 5mg, Omeprazol 200mg, Clopidogrel 75mg, Prednisona (desmame) 80+30mg, Micofenolato 1000mg
GVC12	43	M	LMC	TCTSP ALO AP 6/6	Crônica	TGI	-	Nenhuma

**Tabela 1. Dados dos pacientes:** A tabela mostra os dados obtidos dos prontuários dos pacientes recrutados para o estudo. DRM+ (Doença residual Mínima positiva), LA (Leucemia Aguda), LLA (Leucemia Linfocítica Aguda), LMA (Leucemia Mielóide Aguda), LMC (Leucemia Mielóide Crônica). Medida Terapêutica: TCTH (Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas), TCTSP ( Transplante de Células-Tronco de Sangue Periférico), TMO ( Transplante de Medula Óssea), ALO(Alogênico), AP (Aparentado), NAP (Não aparentado).

#### 4.4. Plasmas de DECH não alteram a viabilidade/proliferação das CTMs

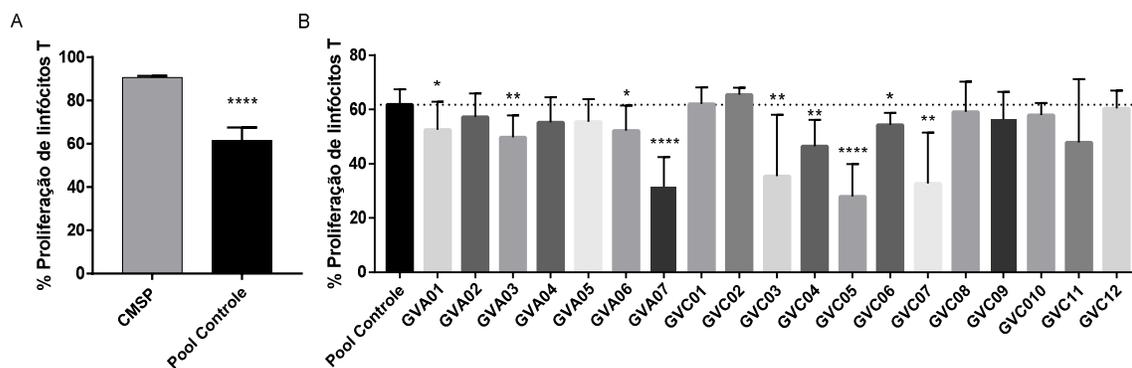
O licenciamento das CTMs com os plasmas dos pacientes com DECH não alterou a proliferação/viabilidade dessas células quando comparado com as CTMs tratadas com o pool de plasma controle (Figura 5).



**Figura 5: Análise da Viabilidade/Proliferação Celular:** As CTMs foram licenciadas por 24 hs com 15% de plasma de DECH aguda (A) ou com 15% de plasma de DECH crônica (B) e submetidas a avaliação temporal da proliferação/viabilidade celular. Os valores são representativos de uma das CTM utilizadas no estudo como média de uma triplicata. Grupos independentes foram analisados por teste *t* não pareado.

#### 4.5. Licenciamento das CTMs com plasma de DECH realça a capacidade supressiva dessas células.

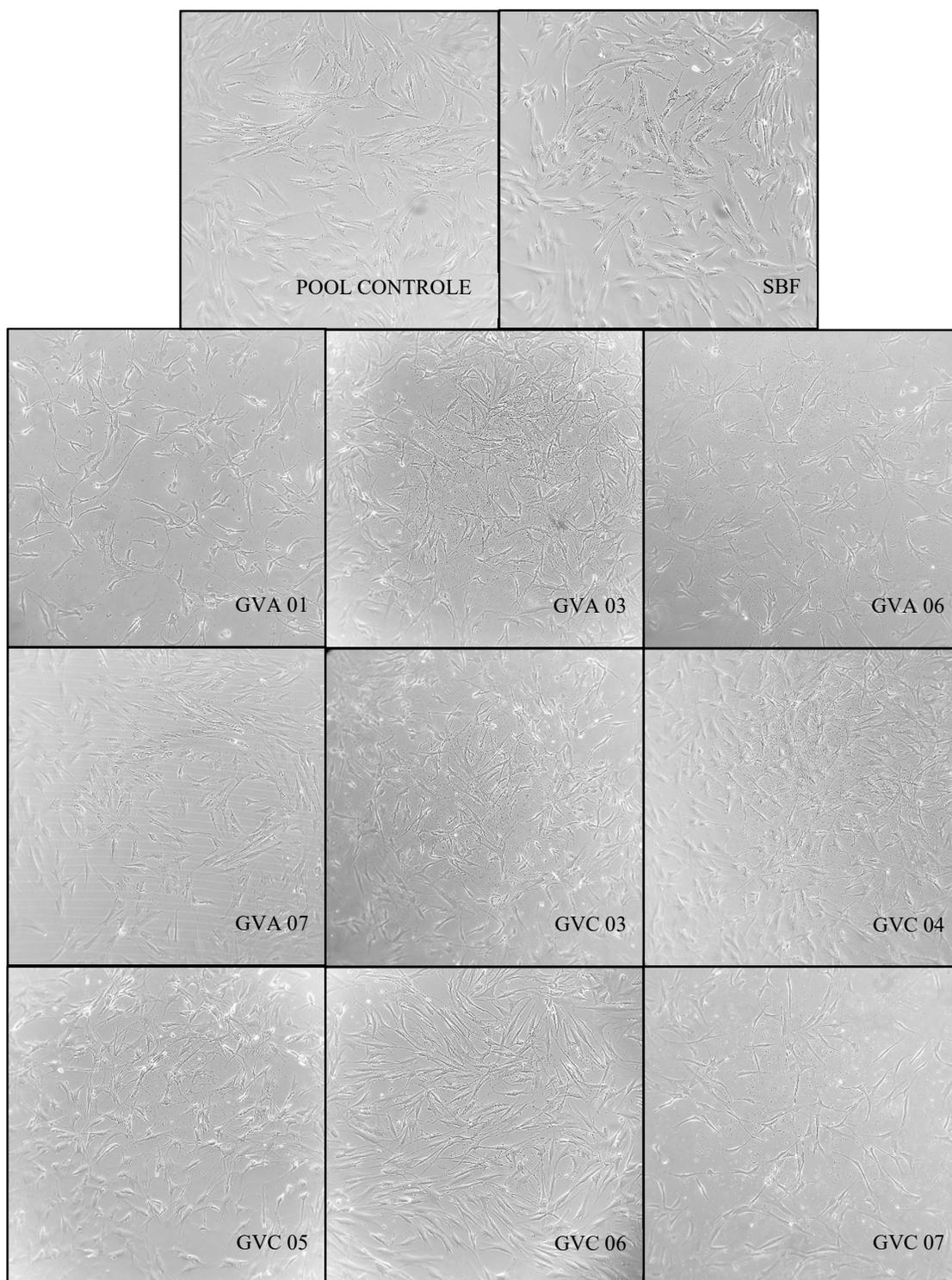
As CTMs de tecido adiposo foram capazes de diminuir a proliferação dos linfócitos T ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6a). O licenciamento das CTMs por 24 h com os plasmas de DECH foi capaz de realçar a capacidade supressiva das CTMs. Nesse contexto, as CTMs licenciadas com os plasmas GVA01 ( $p = 0,04$ ), GVA03 ( $p = 0,006$ ), GVA06 ( $p = 0,02$ ), GVA07 ( $p < 0,0001$ ), GVC03 ( $p = 0,009$ ), GVC04 ( $p = 0,003$ ), GVC05 ( $p < 0,0001$ ), GVC06 ( $p = 0,01$ ) e GVC07 ( $p = 0,002$ ) foram capazes de diminuir significativamente a proliferação dos linfócitos T quando comparadas com o Pool controle.



**Figura 6: Co-cultivo de CMSP com CTMs.** (A). As CTM de tecido adiposo foram capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T ( $p < 0,0001$ ). (B) O licenciamento de CTMs com plasmas de DECH apresentou resultados heterogêneos, onde alguns plasmas foram capazes de realçar a capacidade supressiva das CTMs. Os resultados são representados como média de duas CTMs utilizadas no estudo. \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.6. Licenciamento com Plasmas de DECH causa alterações morfológicas nas CTMs

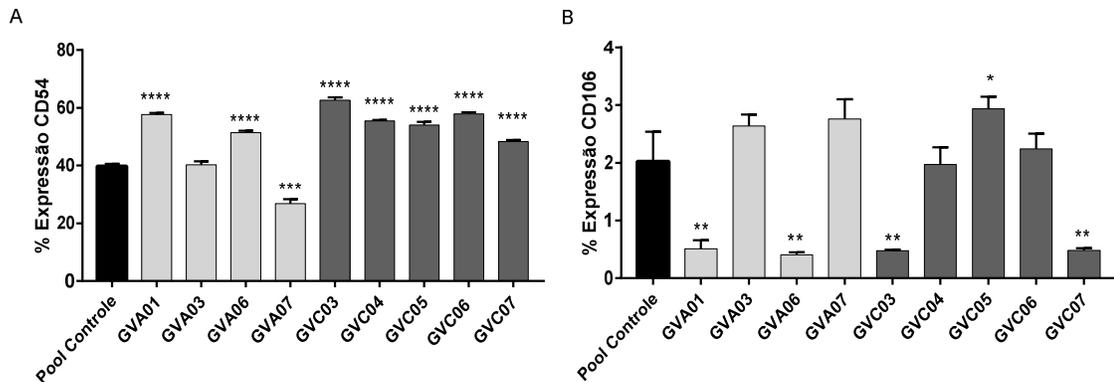
Após 24 horas de licenciamento, observamos que os plasmas de DECH GVA01, GVA03, GVA06, GVC03, GVC04, GVC05 e GVC07 foram capazes de induzir mudanças morfológicas nas CTMs de tecido adiposo quando comparadas com as CTMs licenciadas com o Pool controle e no cultivo tradicional com SBF (Figura 7).



**Figura 7: Alterações Morfológicas das CTMs:** Alterações morfológicas sofridas pelas CTMs após o licenciamento por 24 horas com os plasmas de pacientes com DECH, quando comparadas com SFB e com plasma controle. As imagens foram obtidas com auxílio do microscópio Primo Vert (Carl Zeiss).

#### 4.7. Plasmas de DECH modulam a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em CTMs

As CTMs de tecido adiposo licenciadas com o Pool controle apresentaram expressão média de 39,8% de ICAM-1 e 2,03% de VCAM-1. Houve um aumento significativo na expressão de ICAM-1 (Figura 8a) nas CTMs licenciadas com os plasmas de DECH GVA01 ( $p < 0,0001$ ), GVA06 ( $p < 0,0001$ ), GVC03 ( $p < 0,0001$ ), GVC04 ( $p < 0,0001$ ), GVC05 ( $p < 0,0001$ ), GVC06 ( $p < 0,0001$ ) e GVC07 ( $p < 0,0001$ ). Em contrapartida, foi observado uma diminuição nos níveis de ICAM-1 nas CTMs licenciadas com o plasma GVA07 ( $p = 0,0001$ ). Em relação à expressão de VCAM-1 (Figura 8b), foi observado um aumento significativo na sua expressão em CTMs licenciadas com o plasma GVC05 ( $p = 0,02$ ). Por outro lado, observamos diminuição da sua expressão em CTMs tratadas com os plasmas GVA01 ( $p = 0,003$ ), GVA06 ( $p = 0,002$ ), GVC03 ( $p = 0,003$ ) e GVC07 ( $p = 0,003$ ).

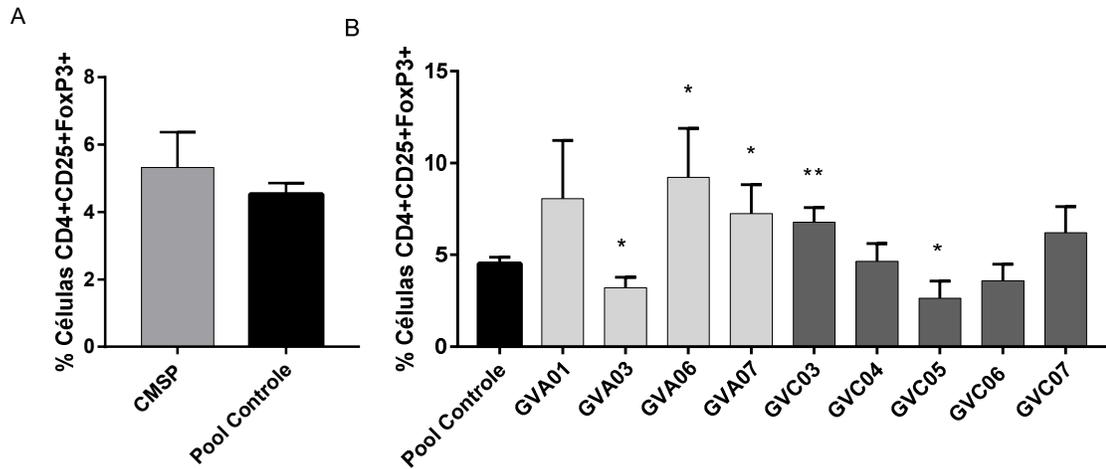


**Figura 8: Expressão de ICAM-1 e VCAM-1.** O licenciamento das CTMs com o plasma de pacientes com DECH foi capaz de modular a expressão de ICAM-1 (CD54) (A) e VCAM-1 (CD106) (B). \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.8. Plasmas de DECH modulam a geração de células T regulatórias

O licenciamento das CTMs com Pool controle não mostrou diferenças significativas na geração de células  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  quando comparadas com as CMSP estimuladas por PHA sem CTMs (Figura 9a). Contudo, o licenciamento das CTMs com os plasmas GVA06 ( $p = 0,01$ ), GVA07 ( $p = 0,02$ ) e GVC03 ( $p = 0,005$ ) foi capaz de aumentar de forma significativa a geração dessas células. Em contrapartida, foi observado também uma diminuição significativa

da geração dessas células em CTMs tratadas com os plasmas GVA03 ( $p=0,01$ ) e GVC05 ( $p=0,01$ ) (Figura 9b).

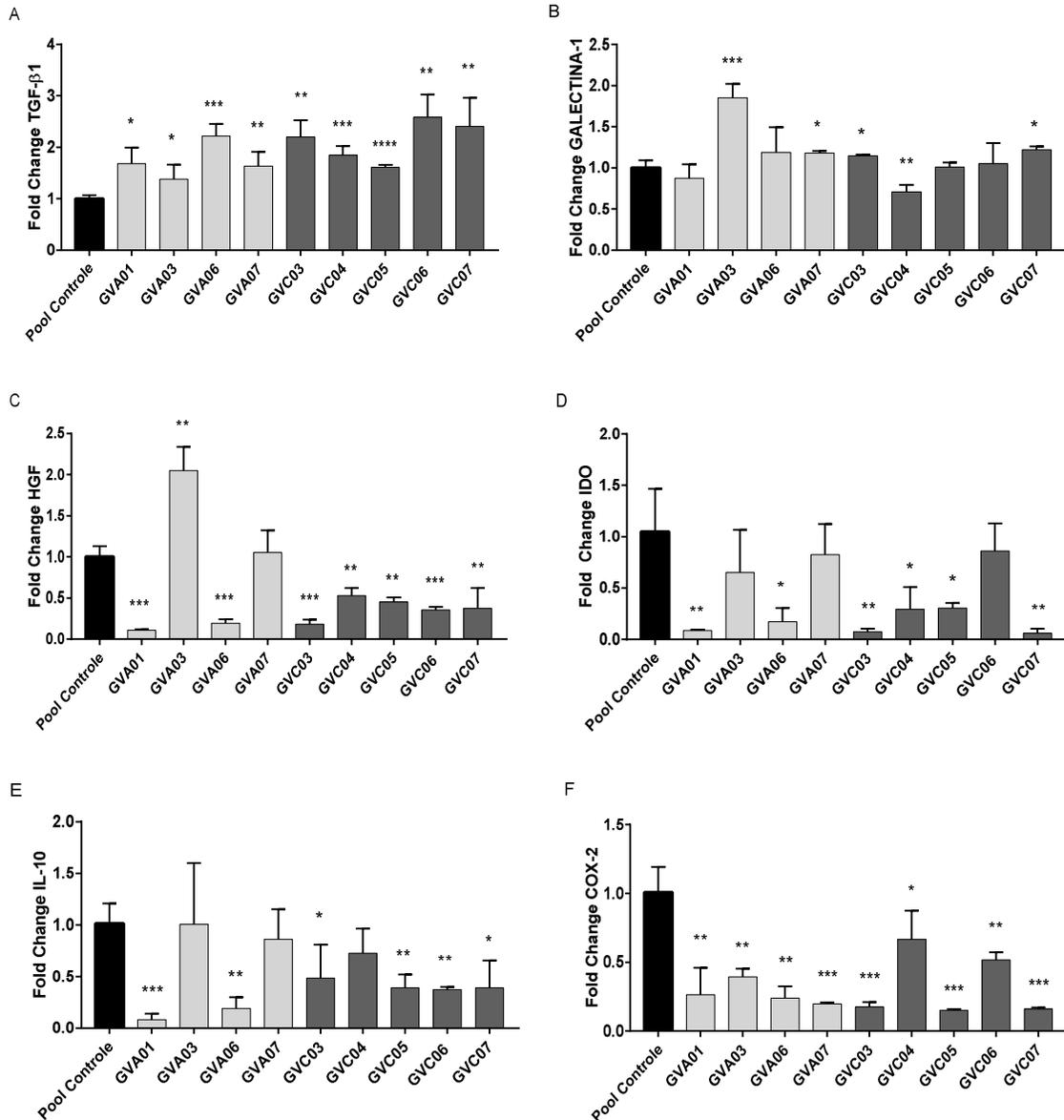


**Figura 9: Geração de células T regulatórias.** (A) O licenciamento das CTMs com os plasmas de pacientes com DECH não mostrou alterações significativas na geração de Tregs. (B) Os plasmas de DECH foram capazes de modular a capacidade das CTMs em induzir a geração de Tregs. \*significa  $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$

#### 4.9. Perfil Transcricional das CTMs licenciadas

Todas as CTMs submetidas ao licenciamento com os plasmas de DECH apresentaram aumento significativo na expressão de TGF- $\beta$ 1: GVA01 ( $p=0,01$ ), GVA03 ( $p=0,04$ ), GVA06 ( $p=0,0005$ ), GVA07 ( $p=0,009$ ), GVC03 ( $p=0,001$ ), GVC04 ( $p=0,0007$ ), GVC05 ( $p<0,0001$ ), GVC06 ( $p=0,001$ ) e GVC07 ( $p=0,006$ ). Observamos ainda um aumento significativo na expressão de GAL-1 nas CTMs tratadas com os plasmas GVA03 ( $p=0,0008$ ), GVA07 ( $p=0,01$ ), GVC03 ( $p=0,02$ ) e GVC07 ( $p=0,01$ ). Contudo, houve uma diminuição na expressão desse transcrito quando as CTMs foram expostas ao plasma GVC04 ( $p=0,007$ ). Em relação ao HGF, foi observado um aumento na sua expressão frente ao tratamento com o plasma GVA03 ( $p=0,002$ ) e uma diminuição quando as CTMs foram tratadas com os plasmas GVA01 ( $p=0,0001$ ), GVA06 ( $p=0,0002$ ), GVC03 ( $p=0,0002$ ), GVC04 ( $p=0,003$ ), GVC05 ( $p=0,001$ ), GVC06 ( $p=0,0005$ ) e GVC07 ( $p=0,008$ ). De maneira geral, observamos uma baixa expressão de IDO em CTMs tratadas com os plasmas GVA01 ( $p=0,008$ ), GVA06 ( $p=0,01$ ), GVC03 ( $p=0,007$ ), GVC04 ( $p=0,02$ ), GVC05 ( $p=0,01$ ) e GVC07 ( $p=0,007$ ) quando comparadas as CTMs tratadas com o Pool Controle. Resultados similares foram observados com IL-10, onde os plasmas GVA01 ( $p=0,0007$ ), GVA06 ( $p=0,001$ ), GVC03 ( $p=0,03$ ), GVC05 ( $p=0,005$ ), GVC06 ( $p=0,002$ ) e GVC07 ( $p=0,01$ ) diminuíram significativamente a expressão desse

transcrito nas CTMs tratadas com os respectivos plasmas. Quanto à COX-2, todos os plasmas reduziram de forma significativa a sua expressão quando comparadas às CTMs expostas ao pool controle: GVA01 (p=0,004), GVA03 (p=0,002), GVA06 (p=0,001), GVA07 (p=0,0008), GVC03 (p=0,0007), GVA04 (p=0,04), GVC05 (p=0,0006), GVC06 (p=0,005) e GVC07 (p=0,0006).



**Figura 10: Perfil Transcricional das CTMs.** Os gráficos mostram a expressão dos genes (A) TGF-β1, (B) Galectina-1, (C) HGF, (D) IDO, (E) IL-10 e (F) COX-2 nas CTMs licenciadas com o Pool controle e com os Plasmas de DECH. A média de expressão do pool controle foi utilizada como calibrador. Os símbolos significam: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar de promissora no tratamento da DECH, a terapia com CTMs enfrenta alguns desafios, principalmente relacionado a alta quantidade de células necessárias para se obter um efeito terapêutico, juntamente com os resultados heterogêneos observados na prática clínica (WERNICKE et al., 2011; LAMOURY et al., 2011). No presente estudo, buscamos investigar o papel do *milieu* de citocinas envolvidas na DECH sobre as propriedades biológicas das CTMs dando ênfase à imunomodulação, haja vista que o licenciamento com fatores inflamatórios parece ser capaz de realçar esse potencial.

As CTMs de tecido adiposo utilizadas nesse estudo mostram perfil fenotípico clássico de CTM, com elevada positividade para CD44, CD73, CD90 e CD105 (DOMINICI et al., 2006). Os plasmas de DECH utilizados não foram capazes de alterar o fenótipo dessas células, pelo menos, no que diz respeito aos marcadores de superfície clássicos investigados nesse estudo.

Não observamos aumento significativo na proliferação das CTMs mediante a exposição dessas células aos plasmas de pacientes com DECH. Apesar de já ter sido descrito que os derivados do plasma humano aumentam a proliferação de CTMs (MURAGLIA et al., 2015), esse efeito parece ser oriundo especialmente do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (KOELLENSPERGER et al., 2006). É importante ressaltar que nesse estudo utilizamos um modelo de PPP, que diminui consideravelmente os níveis desse fator de crescimento, o que pode, pelo menos em parte, explicar os resultados encontrados. Ademais, nossos plasmas receberam adição de heparina, e já foi demonstrado que esse anticoagulante interfere no crescimento celular de osteoblastos, células musculares e CTMs (KHORANA et al., 2003; HANDSCHIN et al., 2005; GILOTTI et al., 2014). A busca por estratégias que realcem a capacidade proliferativa das CTMs torna-se importante para essa linha de investigação, tendo em vista que o efeito imunossupressivo das CTMs é dependente do número de células (DI NICOLA et al; 2002).

Ainda que o licenciamento das CTMs com INF- $\gamma$  mostre resultados promissores no que diz respeito à capacidade imunorreguladora dessas células (POLCHERT et al., 2008), a combinação de citocinas inflamatórias parece promover um efeito ainda mais intenso (REN et al., 2010), demonstrando a importância do *milieu* inflamatório sobre as suas propriedades. Nessa linha, um estudo conduzido por Leijts et al. (2012) mostrou que o sobrenadante de CTMs

expostas ao ambiente inflamatório encontrado no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide possuem um efeito mais potente no controle da proliferação de linfócitos quando comparado às CTMs não tratadas. Ainda não há dados na literatura que retratem o efeito do plasma de DECH sobre as CTMs. Demonstramos pela primeira vez nesse estudo que o licenciamento das CTMs com plasmas de pacientes com DECH é capaz de aumentar o potencial supressivo dessas células quando comparados com CTMs expostas ao pool de plasmas controle. Tal achado pode estar diretamente relacionado com a presença das citocinas pró-inflamatórias contidas nesses plasmas (HENDEN; HILL, 2015). É importante enfatizar que nem todos os plasmas apresentaram tal desfecho, o que indica que além do padrão de citocinas, os medicamentos utilizados por esses pacientes podem impactar nos desfechos observados. Nessa linha, alguns estudos mostram que a combinação de CTMs com imunossuppressores realça o potencial imunorregulador dessas células, enquanto outros trabalhos demonstraram que alguns imunossuppressores são capazes de afetar as propriedades das CTMs e podem antagonizar seu efeito imunorregulatório (HOOGDUIJN et al., 2008; BURON et al., 2009; SHI et al., 2011; GIRDLESTONE et al., 2015). Mais importante, nossos dados constituem uma prova de conceito, de que plasmas de DECH podem modular a capacidade supressiva das CTMs.

É interessante notar que os plasmas que aumentaram a capacidade supressiva das CTMs induziram alterações morfológicas nessas células. Achados similares foram relatados por Klinker et al. (2017), onde eles demonstraram que as alterações morfológicas observadas nas CTMs licenciadas por INF- $\gamma$  estavam intimamente relacionadas com CTMs de fenótipo supressor. De fato, alguns grupos atualmente têm usado microscopia de alta resolução para investigar de modo mais acurado a interação entre CTMs e linfócitos e as alterações que as CTMs assumem quando em meio inflamatório.

As moléculas de adesão desempenham papel fundamental na capacidade imunossupressora das CTMs. Nesse estudo, demonstramos que os plasmas de pacientes com DECH são capazes de aumentar a expressão de ICAM-1 em CTMs e de VCAM-1 em casos pontuais. Certamente, essa modulação na expressão de moléculas de adesão pelos plasmas de pacientes com DECH impactou no aumento da capacidade supressiva das CTMs, tendo em vista a atuação essencial dessas moléculas na imunomodulação promovida por essas células (REN et al., 2010). Embora não tenhamos buscado identificar os fatores solúveis responsáveis pelo aumento na expressão dessas moléculas na superfície das CTMs, é importante esclarecer que tem sido discutido que a combinação de INF- $\gamma$  com outras citocinas como IL-1  $\alpha/\beta$  e TNF- $\alpha$  é capaz de aumentar a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 (GAJEWSKI et al., 2006).

A geração de células T regulatórias e sua relação com as CTMs tem sido extensivamente investigada pela comunidade científica (MACCARIO et al., 2005; ENGLISH et al., 2009; GHANNAM et al., 2010). Sabe-se hoje que as Tregs desempenham um papel importante no curso da DECH, em que se observa uma correlação negativa entre a frequência dessas células e a severidade da doença (ZORN et al., 2005; LI et al., 2010; BREMM et al., 2011; MCIVER et al., 2012). Diversos estudos já relataram que as CTMs são capazes de aumentar a geração de Tregs (MACCARIO et al., 2005; AGGARWAL; PITTENGER, 2005; PREVOSTO et al., 2007).

Em nosso estudo, evidenciamos que os plasmas GVA06, GVA07 e GVC03 foram capazes de aumentar significativamente a geração de Tregs. É importante notar que todos os plasmas utilizados aumentaram a expressão do transcrito TGF- $\beta$ 1 nas CTMs, uma citocina envolvida na indução de Tregs (ENGLISH et al., 2009), mas não se observou em todos os casos aumento na geração de Tregs. Mais que isso, os plasmas GVA03 e GVC05, inclusive, foram capazes reduzir a frequência dessas células. Ainda que nossos achados sejam contrastantes, a geração de Tregs não é exclusivamente modulada por TGF- $\beta$ 1. Apesar desse fator de crescimento ser importante nesse contexto, outras citocinas e fatores que não foram avaliadas no nosso estudo, como HLA-G5 (SELMANI et al., 2008) e PGE2 (ENGLISH et al., 2009), também estão envolvidas nesse cenário. Também, devemos destacar que todos os demais estudos que investigaram geração de Tregs por CTMs foram conduzidos em ambiente controlado, com fatores recombinantes em cultura, e não com amostras biológicas complexas. Mais recentemente, um estudo realizado por Rashedi et al. (2016) revelou ainda que além de citocinas, a sinalização de RTT3 e RTT4 em CTMs parece estar diretamente envolvida com a geração de Tregs.

Com o objetivo de investigar os mecanismos moleculares envolvidos na imunomodulação promovida pelas CTMs diante da exposição aos plasmas de DECH, avaliamos a expressão gênica de algumas moléculas importantes nesse cenário. Interessantemente, observamos no presente estudo que todos os plasmas que realçaram a capacidade supressiva das CTMs induziram aumento na expressão de TGF- $\beta$ 1 pelas CTMs, o que pode estar diretamente relacionado com os efeitos observados sobre os linfócitos T, tendo em vista a importância da ação imunossupressora desse fator (NASEF et al., 2006; NEMETH et al., 2010).

Além de TGF- $\beta$ 1, alguns dos plasmas utilizados foram capazes de aumentar significativamente os níveis de GAL-1 nas CTMs. Apesar de relatos da sua interação com o microambiente tumoral e as CTMs (SZE BENI et al., 2012), a GAL-1 exerce um papel importante na supressão da resposta de linfócitos T (SIOUD, 2011) e tem sido detectada tanto intracelularmente quanto na superfície das CTMs (GIESEKE et al., 2010). Em contrapartida, encontramos diminuição dos níveis de GAL-1 nas CTMs tratadas com o plasma GVC04. Entretanto, é importante salientar que esse plasma foi capaz de aumentar significativamente os níveis de ICAM-1 e de TGF- $\beta$ 1 nas CTMs, indicando que o efeito observado pode ser independente da GAL-1.

Notamos também, com exceção do tratamento com o plasma GVA03, que o licenciamento com plasmas de DECH no nosso estudo reduziu a expressão de HGF pelas CTMs. Um estudo conduzido por Chen et al (2014) demonstrou que esse fator de crescimento é capaz de polarizar monócitos para um fenótipo imunorregulador, passando a produzir citocinas como a IL-10 que por sua vez é capaz de suprimir a resposta de outras células do sistema imune.

De maneira geral, as CTMs licenciadas com os plasmas de DECH apresentaram níveis reduzidos de IDO, IL-10 e COX-2. Isso reforça o impacto importante das moléculas de adesão nos desfechos observados pelo nosso estudo. De fato, essas moléculas têm recebido importância crescente nesse cenário. Recentemente foi demonstrado que além de recrutar mais linfócitos através do contato célula-célula, a alta expressão de ICAM-1 nas CTMs parece promover um efeito protetivo em modelos murinos de DECH (TANG et al., 2018).

Nossos dados mostram que utilizando a estratégia de licenciamento por 24 horas, as CTMs apresentam aumento na expressão de moléculas de adesão e da transcrição de fatores imunomoduladores, o que pode ter impactado no aumento do potencial supressivo dessas células. Nossos achados constituem importante prova de conceito e impactam fortemente na área em que se inserem, considerando que o efeito promovido pelas CTMs é dose-dependente (DI NICOLA et al., 2002) e a exposição aos plasmas de DECH pode reduzir a quantidade de células necessárias para obtenção do efeito terapêutico desejado. Apesar de haver necessidade de estudos em modelo murino para validar *in vivo* os efeitos observados, esse estudo da margem para a reflexão de uma possível mudança de abordagem terapêutica que consistiria em desafiar o potencial supressivo das CTMs com o plasma do paciente com DECH, enquanto essas células estivessem em etapa de expansão para infusão.

## 6. CONCLUSÕES

- CTMs de tecido adiposo expressam VCAM-1 e ICAM-1;
- CTMs de tecido adiposo são capazes de inibir a proliferação de linfócitos T;
- O licenciamento com plasmas de DECH não altera a viabilidade/proliferação das CTMs de tecido adiposo;
- O licenciamento com plasmas de DECH é capaz de realçar a capacidade imunossupressora de CTMs de tecido adiposo;
- O licenciamento com plasmas de DECH causa alterações morfológicas nas CTMs de tecido adiposo;
- O licenciamento com plasmas de DECH aumenta a expressão de ICAM-1 em CTMs de tecido adiposo;
- O licenciamento com plasmas de DECH aumenta a expressão de TGF- $\beta$ 1 em CTMs de tecido adiposo;
- O licenciamento com plasmas de DECH diminui a expressão de COX-2,IDO, IL-10 em CTMs de tecido adiposo;

## 7. REFERÊNCIAS

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

ARPAIA N.; GREEN J.A.; MOLTEDO B.; et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. **Cell**. v.162, p. 1078–89, 2015.

ASAVAROENGCHAI, W.; WANG, H.; WANG S.; et al. An essential role for IFN-gamma in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biology Blood Marrow Transplant**. v.13, n.1, p.46-55, 2007.

AUGELLO, A.; TASSO, R.; NEGRINI, S.; 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.

BACHER, P.; HEINRICH, F.; STERVBO, U. et al. Regulatory T cell specificity directs tolerance versus allergy against aeroantigens in humans. **Cell**. v.167, n. 4, p. 1067-1078, 2016.

BALL, L.M.; EGELER, R.M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. **Bone Marrow Transplantation**. v.41, n.2, p.58–64, 2008.

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.

BLASER, B. W.; ROYCHOWDHURY, S.; KIM, D. J.; et al. Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease. **Blood**. v.105, n.2, p.894-901, 2005.

BLAZAR, B.R.; MURPHY, W.J.; ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nature reviews Immunology**. v.12, n.6, p.443-458, 2012.

BLAZAR, B.R.; TAYLOR, P.A.; SMITH, S.; et al. Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts. **Blood**. v.85, p.842–51, 1995.

BREMM, M.; HUENECKE, S.; LEHRNBECHER, T. et al. Advanced flow cytometric analysis of regulatory T cells: CD127 downregulation early post stem cell transplantation and altered Treg/CD3(+) CD4(+)-ratio in severe GvHD or relapse. **Journal of Immunological Methods**. v.373, p.36–44, 2011.

BUDDE, H.; PAPERT, S.; MAAS, J.-H., et al. Prediction of graft-versus-host disease: a biomarker panel based on lymphocytes and cytokines. **Annals of Hematology**. v.96, n.7, p.1127–1133, 2017.

BURMAN, A.C.; BANOVIC, T., KUNS, R.D.; et al. IFN- $\gamma$  differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. **Blood**. v.110, n.3, p.1064–1072, 2007.

BURON, F.; PERRIN, H.; MALCUS, C.; et al. Human Mesenchymal Stem Cells and Immunosuppressive Drug Interactions in Allogeneic Responses: An In Vitro Study Using Human Cells. **Transplantation Proceedings**. v. 41, n. 8, p. 3347– 3352, 2009.

CARRERO, R.; CERRADA, I.; LLEDÓ, E.; et al. IL-1 $\beta$  induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- $\kappa$ B. **Stem cells Reviews**. v.8, n.3, p.905-16, 2012.

CHEN, P.-M.; LIU, K.-J.; HSU, P.-J.; et al. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. **Journal of Leukocyte Biology**. v.96, n.2, p.295–303, 2014.

CHINNADURAI, R.; COPLAND, I.B.; PATEL, S.R.; et al. IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN- $\gamma$ -Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Immunology** v.192, n.4, p.1491-1501, 2014.

CHO K.S.; ROH, H.J. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in airway allergic diseases. **Current Stem Cell Research Therapy**. v. 5, p.111–115, 2010.

CHO, K.S.; PARK, H.K.; PARK, H.Y.; et al. IFATS collection: immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model. **Stem Cells**.v.27. p. 259–265, 2009.

CHOI, S.W.; LEVINE, J.E.; FERRARA, J.L.M. Pathogenesis and Management of Graft versus Host Disease. **Immunology and allergy clinics of North America**. v.30, n.1, p.75-101, 2010.

CONGET. P.A.; MINGUELL, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **Journal of Cellular Physiology**. v.181. p 67-73, 1999.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**. v.107, p.367-372, 2006.

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.

DA SILVA, M.L.; 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.

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

- DENG, W.; OBROCKA, M.; FISCHER, I.; et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 282, p.148–152, 2001.
- DI NICOLA, M.; 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, p. 3838-3843, 2002.
- DOMINICI, M; LE BLANC, K; 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. 315-317, 2006.
- ELLISON, C.A.; NATUIK, S.A.; MCINTOSH, A.R.; et al. The role of interferon-gamma, nitric oxide and lipopolysaccharide in intestinal graft-versus-host disease developing in F1-hybrid mice. **Immunology**. v.109, p.440–449, 2003.
- ENGLISH, K., BARRY, F.P., FIELD-CORBETT, C.P., et al. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, v.110, n.2, p.91–100, 2007.
- ENGLISH, K., RYAN, J. M., TOBIN, L., et al. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.156, n.1, p.149-160, 2009.
- FAN, H.; ZHAO, G.; LIU, L.; et al. Pre-treatment with IL-1 $\beta$  enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. **Cellular and Molecular Immunology**. v.9, p.473–481, 2012.
- FANG, B.; SONG, Y.; LIAO, L.; et al. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. **Transplantation Proceedings**. v.39, p.3358–3362, 2007.
- FERRARA, J.L. Graft- versus-host disease. **Lancet**. v.373, p.1550–1561, 2009.
- FERRARA, J.L.; LEVY, R.; CHAO, N.J. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v.5, p.347-356, 1999.
- FERRARA, J.L.M.; DEEG, H.J. Graft versus host disease. **New England Journal of Medicine**. v.324, p. 667–674. 1991.
- FERRARA, J.L.M.; REDDY, P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. **Seminars in hematology**. v.43, n.1, p.3-10, 2006.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**. v. 6, p. 230-247, 1968.

- GAJEWSKI, T.F.; MENG, Y.; BLANK, C.; et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. **Immunological Reviews**. v. 213, p. 131-145, 2006.
- GHANNAM S.; PENE, J.; TORCY-MOQUET, G.; et al. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. **Journal of Immunology**. v.185, p.302–312, 2010.
- GHIMIRE, S.; WEBER, D.; MAVIN, E.; et al. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. **Frontiers in Immunology**. v. 8, 2017.
- GIESEKE, F.; BÖHRINGER, J.; BUSSOLARI, R.; et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. **Blood**, v. 116. p. 3770–3779, 2010.
- GILOTTI, A.C.; NIMLAMOOOL, W.; PUGH, R.; et al. Heparin responses in vascular smooth muscle cells involve cGMPdependent protein kinase (PKG). **Journal of Cellular Physiology**. v.229, p.2142–2152, 2014.
- GIRDLESTONE, J.; PIDO-LOPEZ, J.; SRIVASTAVA, S.; et al. Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs. **Cytotherapy**. v.17, n.9, p.1188–1199, 2015.
- GREINIX, H.T.; VOLC-PLATZER, B.; KALHS, P.; et al. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. **Blood**. v.96, p. 2426–2431, 2000.
- GRINBERG-BLEYER, Y.; OH, H.; DESRICHARD, A.; et al. NF-kappaB c-Rel is crucial for the regulatory T cell immune checkpoint in cancer. **Cell**. v.170, n.6, p.1096-1108, 2017.
- HAN, X.; YANG, Q.; LIN, L.; et al. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. **Cell Death & Differentiation**. v.21, n.11, p.1758-68, 2014.
- HANDSCHIN, A.E.; TRENTZ, O.A.; HOERSTRUP, S.P.; et al. Effect of low molecular weight heparin (dalteparin) and fondaparinux (Arixtra) on human osteoblasts in vitro. **British Journal of Surgery**. v.92, p.177–183, 2005.
- HENDEN, A.S.; HILL, G.R. Cytokines in Graft-versus-Host Disease. **The Journal of Immunology**. v. 194, n.10, p.4604-4612, 2015.
- HILL G.R., CRAWFORD J.M., COOKE K.R. et al. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. **Blood**. v.90, p.3204- 3213, 1997.
- HILL G.R.; FERRARA J.L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**. v.95, p. 2754–9, 2000.

HOOGDUIJN, M.J.; CROP, M.J.; KOREVAAR, S.S.; et al. Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells to Tacrolimus, Mycophenolic Acid, and Rapamycin. **Transplantation**. v.86, n. 9, 2008.

HOOGDUIJN, M.J.; POPP, F.; VERBEEK, R.; et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. **International Immunopharmacology**. v.10, p.1496–1500, 2010.

HU, C.; LI, L.; Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.22, n.3, p.1428-1442, 2018.

IANNI, M.D.; PAPA, B.D.; IOANNI, M.D. et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. **Experimental Hematology**. v.36, p.309-318, 2008.

JACOBSON, D.A.; VOGELSANG, G.B. Acute graft versus host disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v.2, n.1, p. 35, 2007.

JAGASIA, M.; ARORA, M.; FLOWERS, M.E.D.; et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. **Blood**. v.119, n.1, p. 296-307, 2012.

JAGASIA, M.H.; GREINIX, H.T.; ARORA, M.; et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v.21, n.3, p.389–401, 2015.

JANKOVIC, D.; GANESAN, J.; BSCHEIDER, M.; et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. **Journal of Experimental Medicine**. v.210, n.10, p.1899-910, 2013.

JIANG, X.X.; ZHANG, Y.; LIU, B.; et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte derived dendritic cells. **Blood**. v.105, p. 4120–4126, 2005.

KHORANA, A.A.; SAHNI, A.; ALTLAND, O.D.; et al. Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.23, p.2110–2115, 2003.

KHOURY, H.; KASHYAP, A.; ADKINS, D.R.; et al. Treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin. **Bone Marrow Transplantation**. v.27, p. 1059– 1064, 2001.

KICHIAN, K.; NESTEL, F.P.; KIM, D.; et al. IL-12 p40 messenger RNA expression in target organs during acute graft-versus-host disease. Possible involvement of IFN-gamma. **Journal of Immunology**. v.157, p.2851-2856, 1996.

KLINKER, M.W.; MARKLEIN, R.A.; LO SURDO, J.L.; et al. Morphological features of IFN- $\gamma$ -stimulated mesenchymal stromal cells predict overall immunosuppressive capacity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.114, n.13, p.E2598-E2607, 2017.

KLYUSHNENKOVA, E.; MOSCA, J.D.; ZERNETKINA, V.; et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. **Journal of Biomedical Science**. v. 12, p. 47-57, 2005.

KOELLENSPERGER, E.; VON HEIMBURG, D.; MARKOWICZ, M.; et al. Human Serum from Platelet-Poor Plasma for the Culture of Primary Human Preadipocytes. **Stem Cells**. v.24, p.1218-1225, 2006.

KOPEN, G. C., PROCKOP, D. J., AND 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 U.S.A.** v.96, p.10711–10716, 2001.

KRAMPERA, M. Mesenchymal stromal cell licensing: a multistep process. **Leukemia**, v. 25, n. 9, p. 1408–1414, 2011.

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, p. 3722-3729, 2003.

KRETLOW, J.D; JIN Y.Q; LIU W. et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. **BMC Cell Biology**. v.9, n.1, 2008.

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

LANDGRAF, K.; BRUNAUER, R.; LEPPERDINGER, G.; et al. The suppressive effect of mesenchymal stromal cells on T cell proliferation is conserved in old age. **Transplant Immunology**. v.25, p.167–172, 2011.

LE BLANC, K.; FRASSONI, F.; BALL, L.; et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**. v.371, p.1579-1586, 2008

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

LE BLANC, K.; TAMMIK, C.; ROSENDAHL, K.; et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**. v. 31, p. 890-896, 2003.

- LEE, S.J.; KLEIN, J.P.; BARRETTET, A.J.; et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. **Blood**. v.100, p.406–414, 2002.
- LEIJS, M.J.; VAN BUUL, G.M.; LUBBERTS, E.; et al. Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: an explorative in-vitro study. **Frontiers in immunology**. v.3.p.231, 2012.
- LEPELLETIER, Y. LECOURT, S.; RENAND, A.; et al. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring t-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. **Stem Cells and Development**. v. 19, n.7. p. 1075–1079, 2010.
- LEVINE, J.E. Implications of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis and management of GVHD. **International Journal of Hematology**, v.93, n.5, p. 571–577, 2000.
- LI, Q.; ZHAI, Z.; XU, X.; et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. **Leukemia Research**. v.34, p.1158–1168, 2010.
- LIN, M.T.; STORER, B.; MARTIN, P.J.; et al. Relation of an interleukin10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic cell transplantation. **New England Journal of Medicine**. v.349, p.2201–10, 2003.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**. v.25, n.4, p.402–408, 2001.
- LOPATINA, T.; BRUNO, S.; TETTA, C.; et al. Platelet-Derived Growth Factor Regulates the Secretion of Extracellular Vesicles by Adipose Mesenchymal Stem Cells and Enhances Their Angiogenic Potential. **Cell Communication and Signaling**. v.12, n. 26, 2014.
- MA, T.; WANG, X.; JIAO, Y.; et al. Interleukin 17 (IL-17)-Induced Mesenchymal Stem Cells Prolong the Survival of Allogeneic Skin Grafts. **Annals of Transplantation**. v.23, p.615-621, 2018.
- 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**. v.90, p. 516-525, 2005.
- MAITRA, B.; SZEKELY, E.; GJINI, K.; et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. **Bone Marrow Transplantation**. v.33, p. 597-604, 2004.
- MARTIN, P.J.; G SCHOCH, G.; FISHER, L. et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft versus-host disease: Initial treatment. **Blood**. v.76, p.1464 –1472, 1990.

MCIVER, Z.; MELENHORST, J.J.; WU, C.; et al. Donor lymphocyte count and thymic activity predict lymphocyte recovery and outcomes after matched-sibling hematopoietic stem cell transplant. **Haematologica**. v.98, p.346–352, 2012.

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, p. 4619-4621, 2004.

MO, M.; WANG, S.; ZHOU, Y.; et al. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.73, n.17, p.3311–3321, 2016.

MOHTY, M.; BLAISE, D.; FAUCHER, C.; et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. **Blood**. v.106, n.13, p.4407-4411, 2005.

MORISHIMA, Y.; SASAZUKI, T.; INOKO, H.; et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. **Blood**. v.99, p. 4200–4206, 2002.

MUGURUMA, Y.; YAHATA, T.; MIYATAKE, H.; et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. **Blood**. v.107, n.5, p.1878-87, 2006.

MURAGLIA, A., TODESCHI, M.R., PAPAIT, A.; et al. Combined platelet and plasma derivatives enhance proliferation of stem/progenitor cells maintaining their differentiation potential. **Cytotherapy**, v.17, n.12, p.1793–1806, 2015.

NAJAR, M.; RAICEVIC, G.; BOUFKER, H. I.; et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. **Cellular Immunology**. v.264, n.2, p.171–179, 2010.

NAJAR, M.; ROUAS, R.; RAICEVIC, G.; et al. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. **Cytotherapy**. v. 11, n.5, p. 570–583, 2009.

NAKAJIMA, C.; MUKAI, T.; YAMAGUCHI, N.; et al. Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. **European Journal of Immunology**. v.32, p.1792-1801, 2002.

NASEF, A.; CHAPEL, A.; MAZURIER, C.; et al. Identification of IL-10 and TGF- $\beta$  Transcripts Involved in the Inhibition of T-Lymphocyte Proliferation During Cell Contact With Human Mesenchymal Stem Cells. **Gene Expression**. v.13, n.4, p.217–226, 2006.

NEMETH, K.; KEANE-MYERS, A.; BROWN, J.M.; et al. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. v.107, n.12, p.5652-5657, 2010.

NIKOLIC, B., LEE, S., BRONSON, R. T. ET AL. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. **Journal of Clinical Investigation**. v.105, p.1289-1298, 2000.

OKAMOTO, S.; FUJIWARA, H.; NISHIMORI, H.; et al. Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease via Suppression of IFN- $\gamma$ /IL-17-Producing Cells. **The Journal of Immunology**. v.194, n.3, p.1357-1363, 2014.

OOI, J.D.; PETERSEN, J.; TAN, Y.H.; et al. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. **Nature**. v.545, p.243-7, 2017.

PACZESNY, S.; KRIJANOVSKI, O.I.; BRAUN, T.M.; et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. **Blood**. v.113, n.2, p.273-278, 2009.

PASQUINI, M.C.; WANG, Z.; HOROWITZ, M.M.; et al. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. **Clinical Transplants**. v.87, p.105, 2010.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v.29, n.9, p.45, 2001.

PITTENGER, 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., et al. IFN- $\gamma$  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.

POTIAN, J.A.; AVIV, H.; PONZIO, N.M.; et al. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. **Journal of Immunology**. v.171, p. 3426-3434, 2003.

PREVOSTO, C.; ZANCOLLI, M.; CANEVALI, P.; et al. Generation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica**. v.92, n.2, 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.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**. v.276, p. 71-74, 1997.

- PRZEPIORKA, D.; Weisdorf, D.; Martin, P.; et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. **Bone Marrow Transplantation**. v.15, p.825-828, 1995.
- RAFEI, M.; CAMPEAU, P.M.; AGUILAR-MAHECHA, A.; et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. **Journal of Immunology**. v.182, p.5994–6002, 2009.
- RAMASAMY, R.; FAZEKASOVA, H.; LAM, E.W.; et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. **Transplantation**. v.83, p.71–76, 2007.
- RASHEDI, I., GÓMEZ-ARISTIZÁBAL, A., WANG, X.-H., et al. TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling. **Stem Cells**, v.35, n.1, p.265–275, 2016.
- RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**. v. 312, p. 2169-2179, 2006.
- REDDY P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. **Hematological Oncology**. v.21, p.149–161, 2003.
- REDDY, P.; ARORA, M.; MARTIN GUIMOND, M.; et al. GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v.15, p. 162–168, 2008.
- REN, G., ZHAO, X., ZHANG, L. et al., Inflammatory cytokine induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. **The Journal of Immunology**. v.184, n.5, p. 2321–2328, 2010.
- RIES, C; EGEE, V; KAROW M. et al. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. **Blood**. v.109, n.9, p.4055-63, 2007.
- RINGDEN, O; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. v.24, n.1, p.65–72, 2011.
- ROSENBERG, M.; LUTZ, M.; KÜHL, C.; et al. Coculture with hematopoietic stem cells protects cardiomyocytes against apoptosis via paracrine activation of AKT. **Journal of Translational Medicine**. v.10, n.115, 2012.
- RYAN, J.M., BARRY, F., MURPHY, J. M., et al. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.149, n.2, p.353-63, 2007.

SALDANHA-ARAUJO, 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, p. 66-74, 2011.

SALDANHA-ARAUJO, 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- $\kappa$ 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.

SCHROEDER, M.A.; DIPERSIO, J.F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. **Disease Models & Mechanisms**. v.4, n.3, p.318-333, 2011.

SELMANI, Z.; NAJI, A.; ZIDI, I.; et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. **Stem Cells**. v.26, p.212–222, 2008.

SHI, D.; LIAO, L.; ZHANG, B.; et al. Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF-kappaB signaling. **Experimental Hematology**. v.39, p.214–24, 2011.

SHLOMCHIK, W.D.; COUZENS, M.S.; TANG, C.B.; et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. **Science**. v.285, p.412-415, 1999.

SIOUD, M. New Insights into Mesenchymal Stromal Cell-Mediated T-Cell Suppression through galectins. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.73, n.2, p.79-84, 2011.

SIVANATHAN, K.N.; ROJAS-CANALES, D.M.; HOPE, C. M.; et al.; Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. **Stem Cells**. v.33, n.9, p.2850–2863, 2015.

SOTIROPOULOU P. A., PEREZ, S.A.; GRITZAPIS, A.D.; et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. **Stem Cells**. v.24, p.74–85, 2006.

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

STILES, L.N.; HOSKING, M.P.; EDWARDS, R.A.; et al. Differential roles for CXCR3 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell trafficking following viral infection of the CNS. **European Journal of Immunology**. v.36, p.613-622, 2006.

SZEBENI, G.J.; KRISTON-PÁL, É.; BLAZSÓ, P.; et al. Identification of Galectin-1 as a Critical Factor in Function of Mouse Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Tumor Promotion. **PLoS ONE**. v.7, n.7, p.e41372, 2012.

TADDIO, A.; TOMMASINI, A.; VALENCIC, E.; et al. Failure of interferon- $\gamma$  pre-treated mesenchymal stem cell treatment in a patient with Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**.v.21, n.14, p.4379-4384, 2015.

TANG, B.; LI, X.; LIU, Y.; et al. The Therapeutic Effect of ICAM-1-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells on Acute Graft-Versus-Host Disease. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v.46, n.6, p.2624–2635, 2018.

TENG, X.; CHEN, L.; CHEN, W.; et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v.37, n.6, p.2415-24, 2015.

TSE, W.T.; PENDLETON, J.D.; BEYER, W.M.; et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**. v. 75, p. 389-397, 2003.

TYNDALL, A. Mesenchymal stem cell treatments in rheumatology—a glass half full? **Nature Reviews Rheumatology**, v.10, n.2, p.117–124, 2013.

VIGNALI, D.A.; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**. v.13, p.722-728, 2012.

WANG, H.; ASAVAROENGCHAI, W.; YONG, Y.B.; et al. Paradoxical effects of IFN- $\gamma$  in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury. **Blood**. v.113, n.15, p.3612–3619, 2009.

WANG, H.; YANG, Y.G. The complex and central role of interferon- $\gamma$  in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity. **Immunological Reviews**. v.258, n.1, p.30–44, 2014.

WATERMAN, R.S.; TOMCHUCK, S.L.; HENKLE, S.L.; et al. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. **PLoS ONE**. v.5.4, 2010.

WELNIAK, L.A.; BLAZAR, B.R.; MURPHY, W.J. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Annual Review of Immunology**. v.25, n.1, p.139–170, 2007.

WERNICKE, C.M.; GRUNEWALD, T.G.; HENDRIK, J.; 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, n.1, p.27, 2011.

WOLFF, D.; SCHLEUNING, M.; VON HARSDORF, S.; et al. Consensus conference on clinical practice in chronic GVHD: Second - Line Treatment of chronic Graft-versus-Host Disease. **Biology of Blood Marrow Transplantation**. v.17, p.1–17, 2011.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E. J.; PROCKOP, D. J.; et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Journal of Neuroscience**. v. 61, p.364–370, 2000.

WU, Y.; BASTIAN, D.; SCHUTT, S.; et al. Essential Role of Interleukin-12/23p40 in the Development of Graft-versus-Host Disease in Mice. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v.21, n.7, p.1195–1204, 2015.

YANG, S.H.; PARK, M.J.; YOON, I.H.; et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. **Experimental and Molecular Medicine**. v.41, n.5, p. 315–324, 2009.

YANG, Y.G.; QI, J.; WANG, M.G.; et al. Donor-derived interferon- $\gamma$  separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. **Blood**. v.99, p.4207–15, 2002.

YANG, Z.X.; HAN, Z.B.; JI, Y.R.; et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. **PLoS One**. v.8, n.3, p.e59354, 2013.

YOO, J.K.; KIM, J.; CHOI, S.J.; et al. Discovery and Characterization of Novel MicroRNAs During Endothelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells and Development**. v.21, n.11, p.2049–2057, 2012.

ZORN, E.; KIM, H.T.; LEE, S. J.; et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. **Blood**. v.106, p.2903-2911, 2005.