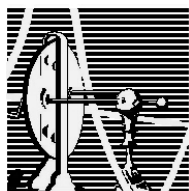


*Bárbara Du Rocher D'Aguiar Silva*

## Propriedade Imunomodulatória das células tronco mesenquimais

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas  
(Biofísica)



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*Bárbara Du Rocher D'Aguiar Silva*

Propriedade Imunomodulatória das células tronco  
mesenquimais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientadora: Eliana Abdelhay

Rio de Janeiro

2009

SILVA, Bárbara Du Rocher D'Aguiar

Propriedade imunomodulatória das células tronco mesenquimais /  
Bárbara Du Rocher D'Aguiar Silva. Rio de Janeiro, 2009.

XVIII, 82p.: il.

Orientadora: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica –  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos  
Chagas Filho, 2009.

1. Imunomodulação 2. Células tronco mesenquimais 3. DECH

I. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck (Orient.)

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de  
Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF)

III. Propriedade imunomodulatória das células tronco mesenquimais.

*Bárbara Du Rocher D'Aguiar Silva*

Propriedade Imunomodulatória das células tronco  
mesenquimais

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

---

Dra. Eliana Abdelhay, INCa

---

Dr. Martin Hernan Bonamino, INCa

---

Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg, UFRJ - Biofísica

---

Dr. Ulisses Gazos Lopes, UFRJ - Biofísica

## Dedicatória

À Dú, Deca e Bú

## Agradecimentos

Este foi sem dúvida o item da tese que deu mais trabalho. Sei lá...talvez pela dificuldade de agradecer as pessoas da forma que elas realmente merecem ou simplesmente por receio de esquecer alguém que tenha sido importante. Mas pai e mãe podem ficar tranquilos, esquecer vocês é impossível. Muito obrigada por fazerem de mim o que sou, por me permitirem sonhar, realizar, vibrar enfim... VIVER. Pai, obrigada por me mostrar o caminho dos estudos e a beleza da vida nos mínimos detalhes e mãe, obrigada por ser o exemplo de garra e determinação.

Garra e determinação me fazem lembrar outra pessoa, minha querida orientadora Eliana. Eu sempre “fui com a sua cara”!!! Obrigada por me “acolher” e pelo voto de confiança. Você tinha razão...estamos aprendendo muitas coisas juntas e eu estou adorando. Obrigada por lapidar minha empolgação grosseira e por me iniciar ao mundo da pesquisa com tanta competência.

Competência? Isso me remete ao Bubu...meu querido irmão. Este cara é o cara...ainda vai bancar meu laboratório só com dindin da engenharia de petróleo. Obrigada por tudo, pelo amor, pelo exemplo, pelas aventuras juntas, enfim... por ser um irmão tão especial. Felicidades para você e para a Piu!!!

Felicidade? Isso me faz lembra alguém: Jú, meu grande amigo, amante e companheiro. Obrigada pelo amor, pelas boas conversas e risadas, por estar comigo nos bons e maus momentos enfim...por ser a melhor companhia para todos os momentos. E lógico, obrigada pela ajuda científica :)

Falando em ajuda, ferrou! Quantas pessoas me ajudaram? Vamos começar pela Bernadete, grande Bê. Amizade não se agradece mas, mesmo assim, obrigada pela amizade e lógico...por me ensinar muitas das coisas que sei sobre citometria de fluxo. Sua ajuda foi providencial. Andrezito, sua ajuda também foi essencial...obrigada pela boa companhia e por me introduzir ao mundo da biologia molecular...nossa parceria tem dado bons frutos. Agradecer também me faz lembrar outra pessoa importante, professor Henrique Teixeira da UFJF, obrigada pelo reconhecimento, pelo incentivo e pelas boas conversas.

Ao laboratório de Imunologia, minha porta de entrada ao INCa. À Hilda, Maria Helena, Bernadete, Mércia, Karen, Carla, Cláudia, Deborah, Aline Oliv., Aline Sing

meus sinceros agradecimentos....Obrigada por fazerem da rotina algo tão descontraído, enfim...Valeu a pena.

Aos meus companheiros do LCT, Carol, Jurebis, Nara, Elis, Dani grande, Gabi, Andrezito, Dani "Sles", Yve, Tati, Lú em transformação, "Stery", Renata, Jaime, Amanda, Jana, Lili. Obrigada por terem feito do lab. um lugar tão divertido e alegre e também pelas inúmeras conversas produtivas sobre ciência. Vamos que vamos...

Aos meus companheiros do banco de sangue Mário, Sueli, Flávio etc... por me receberem tão bem mesmo quando eu estava a fim de "literalmente", sugar o sangue dos doadores. Muito obrigada.

Aos doadores de sangue que consentiram a utilização de amostras de sangue.

A revisora da minha tese, professora Rosane Silva. Muito obrigada.

A todos os meus professores que um dia cruzaram meu caminho.

*Aos meus outros amigos....*

Aos meus avós: Déa pela inteligência, Albano pela simplicidade, Hélio por sempre valorizar explicitamente o amor à vida e à família e Alinete por ser tão forte e altruísta.

Às ninas de VR city pela amizade e pelos momentos de alegria, amo vocês minhas coisinhas.

Às minhas amigas Jurebis, Aline & Amanda, aos meus primos Rafa e Tati e ao Zé Dú!!! Adoooro vocês :)

À Sing por ser uma pessoa espiritualmente avançada, rsrs. É sério, te admiro muito.

À Aline Oliv. e a tantos outros amigos por compartilhar comigo os momentos de incertezas e os desafios desta profissão.

E finalmente a Deus...aquele que sempre está ao meu lado e que me deu uma vida maravilhosa. Obrigada!



## Resumo

As células tronco mesenquimais (CTM) dão suporte à proliferação e diferenciação dos progenitores hematopoéticos e possuem atividade imunossupressora tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No contexto do transplante de células tronco hematopoéticas, as CTM ganharam atenção devido a possibilidade de serem utilizadas para aumentar a reconstituição hematopoética e controlar a doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH). Com o intuito de compreender melhor a biologia destas células nós realizamos ensaios *in vitro* para avaliar suas propriedades imunomodulatórias. Nossos resultados mostraram que as CTM foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos (n=12; \*\*p<0,01). Todas as subpopulações de linfócitos estudadas (Th, Tc, NK e B) foram susceptíveis à modulação mostrando algum grau de inibição, sempre maior que 50% (n=4 \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). As CTM foram capazes de inibir a proliferação mesmo quando separadas por uma membrana de transwell sugerindo que esta inibição é mediada por fatores solúveis (n=5; \*\*p<0,01). Com o intuito de compreender melhor este mecanismo, as CTM foram substituídas por meio condicionado de cultura primária de CTM e, neste caso, não houve inibição (n=5; p>0.05). Estes resultados sugerem que as CTM precisam receber algum sinal das células mononucleares (CMN) para agirem de forma supressora.

Interessantemente, a presença de CTM aparentemente alterou a morfologia dos monócitos. Esta alteração foi acompanhada de um aumento na frequência dos monócitos que não foi devido à proliferação, sugerindo que as CTM aumentam a viabilidade dos monócitos. Além disso, as CTM impediram a aquisição do CD16 pelos monócitos provavelmente mantendo-os com um fenótipo supressor. As CTM também induziram um aumento nos níveis de mRNA dos fatores de transcrição Foxp3 e ROR $\gamma$ t em CMN. O aumento de Foxp3 pode ser resultado da expansão de células T regulatórias porém, o aumento de ROR $\gamma$ t não está claro ainda e está sobre investigação por nosso grupo.

Uma melhor compreensão desta imunossupressão *in vitro* pode contribuir para estudos em modelos animais e em ensaios clínicos possibilitando o desenvolvimento de uma terapia celular de grande aplicabilidade para a contenção da DECH e de outras doenças imunológicas.

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) support the proliferation and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells and possess immunomodulatory activity both *in vitro* and *in vivo*. In the Bone Marrow Transplantation setting those cells have gained much attention due the possibility to use them to improve hematopoietic recovery and to control graft-*versus*-host disease (GVHD). In attempt to understand better the biology of MSC we have performed *in vitro* assays to evaluate those immunomodulatory properties. Our results showed that MSC were able to inhibit lymphocyte proliferation (n=12; \*\*p<0,01). All subpopulation of lymphocyte studied (Th, Tc, NK and B) were susceptible to MSC modulation showing some degree of inhibition, always more than 50% (n=4 \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). MSC had inhibitory activity even in a transwell system suggesting that this inhibition is mediated by soluble factors (n=5; \*\*p<0,01). In order to evaluate the mechanism underlying this phenomena, conditioning medium from primary culture were used instead of MSC showing no inhibitory activity (n=5; p>0.05). This results strongly suggest that MSC needs to receive some sign from mononuclear cells to act as suppressor cells.

Interestingly, the presence of MSC apparently induced morphological changes in monocyte population. This alteration was accompanied by an increase in monocyte frequency that was not due to proliferation, suggesting that MSC increase the viability of monocyte population. Moreover, MSC inhibit the acquisition of CD16 by monocytes, probably maintaining those cells with a suppressor phenotype. MSC also induce mRNA expression of Foxp3 and ROR $\gamma$ t genes in mononuclear cells. The increase in Foxp3 could be a result of regulatory T cells expansion but the increase in ROR $\gamma$ t gene is not clear yet and is under investigation by our group.

A better detail of this immunosuppression *in vitro* could contribute to studies in animal models and in clinical trials allowing the development of a very useful cellular therapy to control GVHD and other undesirable immunological diseases.

## Lista de abreviaturas

APC → “Antigen presenting cell”, Célula apresentadora de antígeno

CFSE → “Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester”

CML → Cultura mista de leucócitos

CMN → Células mononucleares

ConA → Concavalina A

CTH → Células tronco hematopoéticas

CTM → Células tronco mesenquimais

DECH → Doença enxerto-contra-hospedeiro

ECL → Efeito enxerto-contra-leucemia

ECT → Efeito enxerto-contra-tumor

G-CSF → “Granulocyte colony-stimulating factor”, Fator estimulador de colônias granulocíticas

HGF → “Hepatocyte growth factor”, Fator de crescimento de hepatócitos

HLA → “Human leucocyte antigen”, Antígenos leucocitários humanos

IDO → Enzima indoleamina 2,3 dioxigenase

iTreg → Células T regulatórias induzidas

IFN- $\gamma$  → Interferon- $\gamma$

LPS → Lipopolissacarídeos

MHC → “Major histocompatibility complex”, Complexo principal de histocompatibilidade

MO → Medula óssea

PBS → Solução Tampão Fosfato

PGE2 → Prostaglandina E2

PHA → Fitohemaglutinina

SBF → Soro fetal bovino

SP → Sangue periférico

TCTH → Transplante de células tronco hematopoéticas

TGF- $\beta$ 1 → “Transforming growth factor- $\beta$ 1”, Fator de crescimento transformador - $\beta$

TNF- $\alpha$  → “Tumor necrosis factor- $\alpha$ ”, Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## Lista de figuras e tabelas

Figura 1 – Esquema de evolução do TCTH.....	2
Figura 2 – Desenho esquemático do TCTH autólogo.....	3
Figura 3 – Desenho esquemático do TCTH alogeneico e singeneico.....	4
Figura 4 – Desenho esquemático das moléculas de HLA.....	7
Figura 5 – Mapa do MHC humano.....	7
Figura 6 – Fases da evolução da DECH aguda.....	11
Figura 7 – Mecanismos de apresentação de antígenos alogeneicos.....	12
Figura 8 – Potencial de diferenciação das CTM.....	16
Figura 9 – Mecanismo de imunossupressão proposto por Aggarwal e cols., 2005.....	24
Figura 10 – Mecanismo de ação das CTM sobre o sistema imunológico.....	24
Figura 11 – Mecanismo de imunossupressão proposto por Groh e cols. via fatores solúveis.....	27
Figura 12 – Possíveis intervenções terapêuticas das CTM no TCTH.....	35
Figura 13 – Estratégia metodológica padrão de análise dos experimentos.....	43
Figura 14 – CTM alogeneicas não estimulam a proliferação de linfócitos.....	48
Figura 15 – CTM inibem a proliferação de linfócitos.....	49
Figura 16 – CTM inibem a proliferação de linfócitos Th, Tc, B e NK.....	51

Figura 17 – As CTM inibem a proliferação de linfócitos independente do contato.....	52
Figura 18 – Meio condicionado de CTM não inibe a proliferação de linfócitos.....	53
Figura 19 – Análise por citometria de fluxo sugere alteração morfológica dos monócitos induzida pelas CTM.....	54
Figura 20 – O percentual de monócitos aumenta em CML na presença de CTM.....	55
Figura 21 – O aumento no percentual de monócitos não se deve a proliferação.....	56
Figura 22 – As CTM impedem a aquisição do CD16 pelos monócitos.....	58
Figura 23 – As CTM alteram o nível de mRNA dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, Foxp3 e ROR $\gamma$ t.....	60
Figura 24 – As CTM precisam receber algum sinal para agirem de forma supressiva.....	65
Figura 25 – Hipótese de imunossupressão proposta pelo nosso grupo.....	68
Figura 26 – Fenótipo de ativação dos linfócitos T auxiliares.....	71
Figura 27 – Os fenótipos de ativação Th17 (ROR $\gamma$ t) e iTreg (Foxp3) são regulados pelo TGB- $\beta$ .....	71
Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para análise por PCR em tempo real.....	47

Tabela 2 – Algumas características que diferem os monócitos CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> dos CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> .....	67
---	----

## Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Transplante de células tronco hematopoéticas.....	1
1.1.1 Tipos de TCTH.....	3
1.1.2 Fonte das CTH.....	4
1.1.3 Grau de histocompatibilidade.....	5
1.1.4 Doença enxerto-contra-hospedeiro.....	8
1.1.4.1 Avanços recentes no tratamento da DECH.....	12
1.2 Células tronco mesenquimais.....	13
1.2.1 CTM e estimulação alogeneica.....	16
1.2.2 Imunomodulação mediada pelas CTM humanas.....	17
1.2.2.1 Interação CTM e linfócitos T.....	18
1.2.2.2 Interação CTM e linfócitos B.....	21
1.2.2.3 Interação CTM e células NK.....	22
1.2.2.4 Interação CTM e células dendríticas.....	22
1.2.2.5 CTM e mecanismo de imunossupressão via fatores solúveis.....	25
1.2.3 Fisiologia das CTM.....	27
1.2.4 CTM e terapias.....	30
1.2.4.1 CTM e terapias de regeneração tecidual.....	30



1.2.4.2 CTM e terapias gênicas.....	31
1.2.4.3 CTM e imunoterapias.....	32
1.2.5 CTM e TCTH.....	32
1.2.5.1 CTM e reconstituição hematopoética.....	33
1.2.5.2 CTM e contenção da DECH.....	34
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Reagentes [concentração de uso].....	38
4.1.1 Reagentes para análise por citometria de fluxo.....	39
4.1.2 Reagentes para análise por PCR em tempo real.....	39
4.2 Culturas de células.....	40
4.2.1 Amostras Biológicas.....	40
4.2.2 Separação de células mononucleares.....	40
4.2.3 Cultura primária de CTM.....	41
4.2.4 Culturas mistas de leucócitos (CML) .....	41
4.3 Metodologias de análise.....	43

4.3.1 Citometria de fluxo.....	43
4.3.1.1 Análise de proliferação de linfócitos alorreativos por CFSE.....	44
4.3.1.2 Análise da freqüência de populações celulares por imunofenotipagem.....	44
4.3.1.3 Análise da viabilidade celular por marcação com 7AAD.....	44
4.3.2 PCR em Tempo-Real.....	45
4.3.2.1 Extração de RNA total.....	45
4.3.2.2 Purificação dos RNAs (Reação de DNase).....	45
4.3.2.3 Transcrição reversa.....	46
4.3.2.4 Elaboração dos primers.....	46
4.3.2.5 Análise do fenótipo de ativação linfocitária por PCR em Tempo-Real.....	47
4.4 Análises estatísticas.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 CTM alogeneicas não estimulam a proliferação de linfócitos.....	48
5.2 As CTM inibem a proliferação linfocitária .....	49
5.3 As CTM inibem a proliferação de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, células B e células NK.....	50
5.4 As CTM inibem a proliferação de linfócitos independente do contato.....	52
5.5 Meio condicionado de CTM não inibe a proliferação de linfócitos.....	53

5.6 As CTM aumentam o percentual de monócitos e parecem alterar sua morfologia.....	54
5.7 O aumento no percentual de monócitos não se deve à proliferação.....	56
5.8 As CTM impedem a aquisição do CD16 pelos monócitos.....	57
5.9 As CTM alteram os níveis de mRNA dos fatores de transcrição que regulam as populações de células T auxiliares: Th1, Th2, Th17 e T regulatória induzida (iTreg).....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
6.1 Cultura mista de leucócitos como modelo proposto para estudar a modulação mediada pelas CTM.....	61
6.2 Status de imunoprivilegiadas.....	63
6.3 Inibição da proliferação de linfócitos pelas CTM.....	64
6.4 Mecanismo de ação das CTM - Interação CTM Monócito.....	65
6.5 Fenótipo de ativação linfocitária.....	68
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

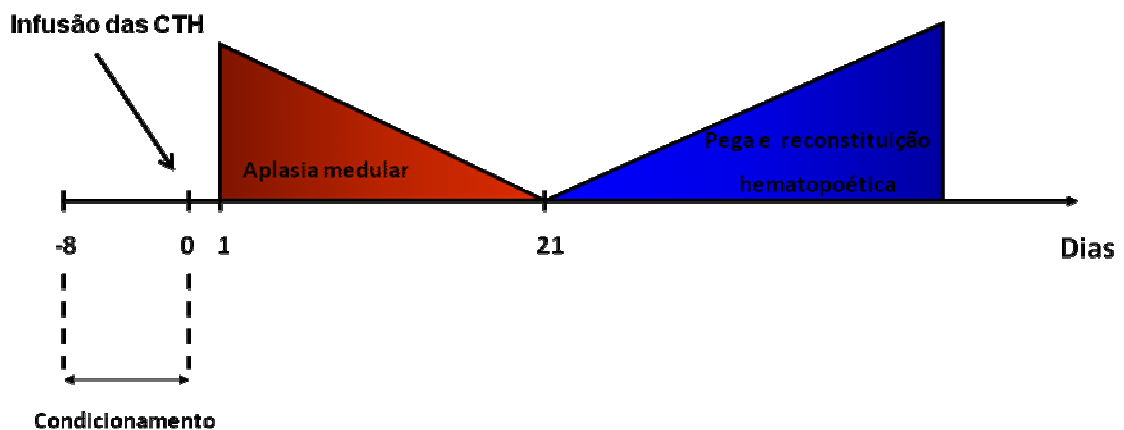
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Transplante de células tronco hematopoéticas

Durante a última metade do século XX o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) tornou-se uma modalidade terapêutica bem estabelecida utilizada para tratar milhares de indivíduos anualmente. O TCTH permite a substituição de um sistema hematopoético anormal, não necessariamente maligno, por um sistema hematopoético eficiente sendo portanto, um tratamento efetivo para doenças não malignas como síndromes de imunodeficiência, anemia aplástica, talassemia, diabetes, entre outros (Appelbaum, 2003).

Embora o TCTH seja a tratamento de escolha para muitas doenças não malignas, grande parte dos pacientes que se submetem ao TCTH constitui-se de pacientes portadores de doenças malignas. O tratamento convencional para estes pacientes é a quimioterapia e/ou radioterapia sistêmica no entanto, devido à toxicidade hematológica causada por estes tratamentos, os mesmos são limitados a uma dose-limite. Para permitir a administração de altas doses de quimioterápicos e de radioterapia potencialmente mais eficazes, tratamento conhecido como regime de condicionamento mieloablativo, muitos centros oncológicos fazem o uso subsequente do TCTH. Assim, os pacientes são submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia em altas doses gerando conseqüentemente uma falência medular e, para reverter este dano, faz-se então o uso do TCTH. Em última análise, para os pacientes portadores de doenças malignas a função primordial do TCTH é reparar um dano irreversível causado pelo tratamento mieloablativo.

Após o regime de condicionamento o paciente recebe, via infusão intravenosa, as células tronco hematopoéticas (CTH) previamente coletadas de um doador. Estas células migram para o microambiente medular, fenômeno conhecido como “homing”, e então o processo de reconstituição hematopoética tem início. Durante todo o período compreendido entre o dia do TCTH (D0) e o início da recuperação hematopoética (D+21) o paciente encontra-se com aplasia medular, imunossuprimido e susceptível a infecções virais, fúngicas, bacterianas e outras. Clinicamente, a “pega medular” é observada após três dias consecutivos de contagem constante de neutrófilos, o que ocorre por volta do dia D+21 (Figura 1).

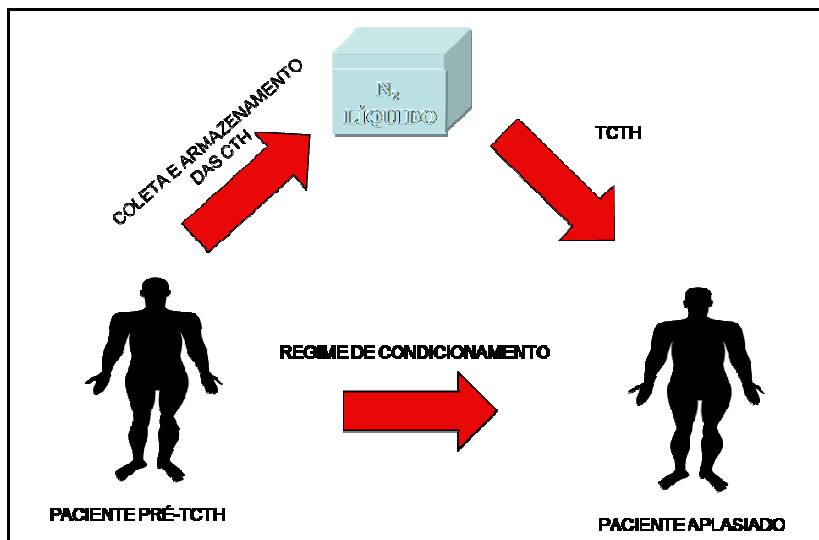


**Figura 1 – Esquema de evolução do TCTH**

D-8 ao D0 → Período em que o paciente é submetido ao regime de condicionamento. O número de dias do tratamento depende da doença de base. D1 ao D21 → Período em que o paciente encontra-se imunossuprimido, este período é de aproximadamente 21 dias. D21 em diante → Período aproximado em que a reconstituição hematopoética é detectada clinicamente.

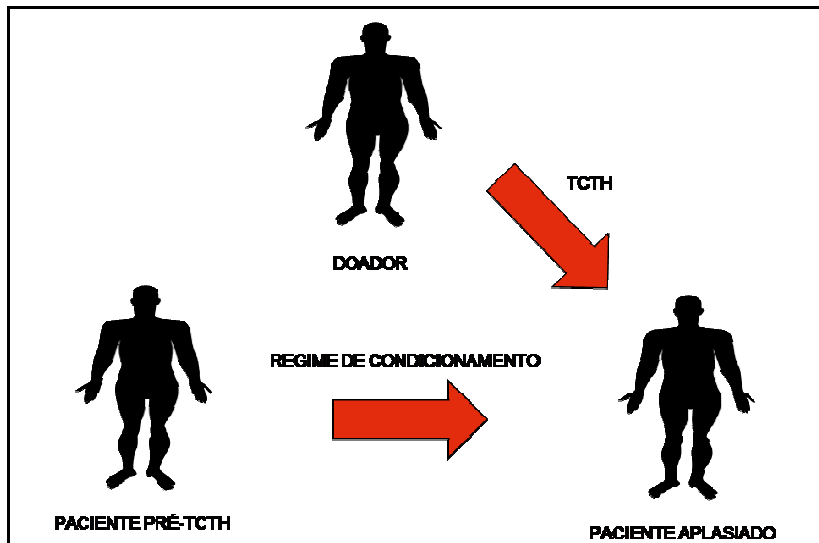
### 1.1.1 Tipos de TCTH

O TCTH pode ser classificado de acordo com a relação familiar entre o doador e o paciente podendo ser autólogo (figura 2), singeneico ou alogeneico (figura 3). O transplante autólogo ocorre quando o doador é o próprio paciente. O transplante singeneico ocorre quando o doador é um irmão gêmeo, geneticamente igual ao paciente e, devido à baixa frequência de gêmeos univitelinos na população, este tipo de modalidade contribui para apenas 1% dos TCTH. Finalmente o transplante alogeneico ocorre quando o doador é geneticamente diferente do paciente, podendo ser um indivíduo aparentado ou não.



**Figura 2 – Desenho esquemático do TCTH autólogo**

Durante um TCTH autólogo as CTH do paciente são mobilizadas para o sangue periférico, coletadas e criopreservadas. Posteriormente o paciente é submetido ao regime de condicionamento mieloablativo e após o regime de condicionamento as CTH são infundidas.



**Figura 3 – Desenho esquemático do TCTH alogeneico e singeneico**

Durante um TCTH alogeneico e singeneico o paciente é submetido ao regime de condicionamento e posteriormente as CTH, coletadas previamente de seu doador, são infundidas.

### 1.1.2 Fonte das CTH

O TCTH também pode ser classificado de acordo com a fonte anatômica das CTH. Tradicionalmente a fonte de CTH para o TCTH é a medula óssea (MO). Neste caso aspirações seguidas da MO são feitas com o intuito de se obter aproximadamente  $3 \times 10^8$  células nucleadas por quilo do paciente (Kumar, 2007). O grau de exposição do doador aliado às novas tecnologias permitiu que novas fontes de CTH fossem desenvolvidas e com isso, fontes como o sangue periférico mobilizado e o sangue de cordão umbilical passaram a ter uma grande importância. O sangue periférico mobilizado consiste na coleta das CTH via periferia sendo necessário portanto, aumentar a concentração destas células que é de aproximadamente 0,02% das células circulantes. Esta mobilização é feita após a administração de fatores de crescimento hematopoéticos, dentre os quais o fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) é o mais utilizado. Embora o

mecanismo de ação ainda não seja completamente compreendido, a administração destes fatores aumenta a concentração das CTH circulantes possibilitando a coleta destes progenitores. Para utilização clínica são necessárias  $5 \times 10^8$  células mononucleares (CMN) ou  $2-5 \times 10^6$  células CD34+ (marcador das CTH) por quilo do paciente (Kumar, 2007). O sangue de cordão umbilical representa uma das grandes promessas para o TCTH pois além de possuir um número considerável de progenitores não oferece nenhum risco para o doador. Para utilização clínica, usualmente doses maiores que  $2-5 \times 10^7$  células nucleadas ou  $2-5 \times 10^5$  células CD34+ por quilo do paciente são consideradas adequadas (Kumar, 2007).

### 1.1.3 Grau de histocompatibilidade

Para pacientes submetidos ao TCTH alogeneico um ponto crucial é a compatibilidade entre o doador e o paciente, determinada pelo grau de histocompatibilidade. Esta compatibilidade é importante para que possamos evitar não só a rejeição das CTH pelo paciente como também a rejeição do paciente pelo enxerto (enriquecido de CTH alogeneicas do doador). O processo de reconhecimento dos antígenos do paciente pelo enxerto ou vice-versa é um fenômeno imunológico disparado pela diferença entre um conjunto de proteínas que contribuem para a determinação da individualidade. Estas proteínas são expressas em co-dominância e são codificadas por um complexo gênico altamente polimórfico denominado complexo principal de histocompatibilidade (MHC), em humanos conhecido como antígenos leucocitários humanos (HLA).

Os genes que compõem o HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6 e seus principais produtos são as moléculas de classe I e moléculas

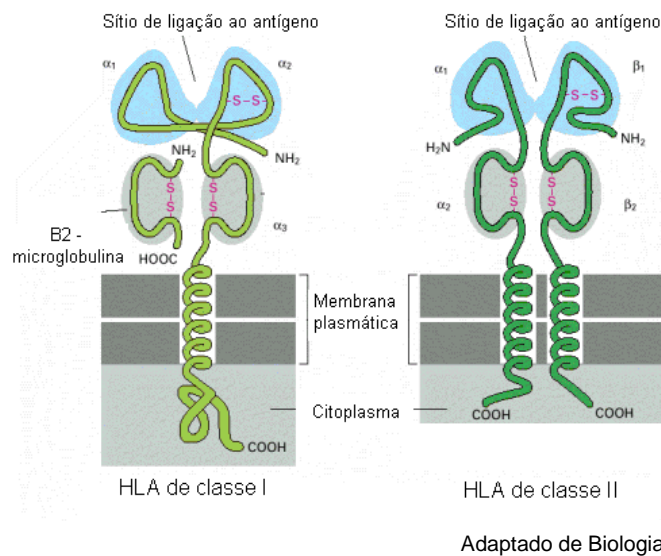


de classe II. As moléculas de classe I são formadas por uma cadeia  $\alpha$  (subdividida em três domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) associada através do domínio  $\alpha_3$  à molécula  $\beta_2$  microglobulina, codificada por um gene no cromossomo 15. A região da molécula responsável por acomodar os peptídeos processados pela célula é formada pelos domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  e constitui a fenda, região de maior polimorfismo da molécula (figura 4). As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e apresentam peptídeos intracelulares para os linfócitos T citotóxicos. Estas moléculas são especialmente úteis na vigilância imunológica pois quaisquer alterações intracitoplasmáticas que gerem proteínas alteradas, como mutações e/ou infecções virais, podem ser detectadas já que estas proteínas poderão ser degradadas e apresentadas via MHC de classe I.

As moléculas de classe II são formadas por duas cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$ , cada uma com dois domínios, totalizando quatro domínios;  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . A fenda é formada pelos domínios  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  e, assim como para as moléculas de classe I, correspondem à região mais polimórfica da molécula (figura 4). As moléculas de classe II estão presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC) como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Estas células são células fagocíticas que, uma vez tendo digerido o peptídeo, o apresentam aos linfócitos T auxiliares via MHC de classe II.

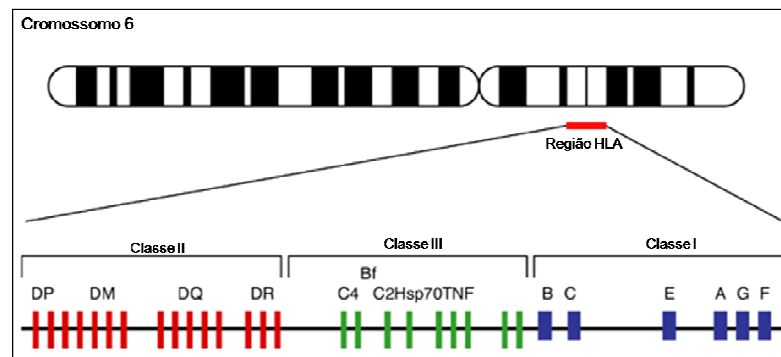
As moléculas de classe I são codificadas por diversos *locus*, entre eles: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F e HLA-G. As moléculas de classe II são codificadas por 4 *locus* diferentes, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DM. Existe ainda uma terceira região, classe III, que codifica para componentes do sistema complemento, três citocinas; fator de necrose tumoral, linfotóxica e linfotóxica –  $\beta$  e algumas proteínas do choque térmico (figura 5).

Para fins de TCTH os *locus* mais relevantes são HLA-A, -B e -DR. Em alguns centros de transplante a compatibilidade para o -DQ também tem sido considerada. Incompatibilidades nestas regiões aumentam significativamente as chances de rejeição do paciente contra o enxerto e vice-versa e, por conta disso, a tipagem de HLA é o primeiro exame utilizado na busca por doadores para o transplante alogeneico (Petersdorf e cols., 1998).



**Figura 4 – Desenho esquemático das moléculas de HLA**

As moléculas de classe I e II diferem não somente em estrutura mas também em função, as moléculas de classe I apresentam antígenos aos linfócitos T citotóxicos enquanto as moléculas de classe II apresentam antígenos aos linfócitos T auxiliares.



Adaptado de Mehra e Kaur, 2003

**Figura 5 – Mapa do MHC humano**

Mapa simplificado que exclui os genes com função desconhecida. A região de HLA localiza-se no braço curto do cromossomo 6 e é composta por três regiões, classe I, II e III.

#### 1.1.4 Doença enxerto-contra-hospedeiro

Em transplantes de órgãos sólidos como os de rim a rejeição é um processo que costuma ser do paciente contra o órgão recebido (enxerto), entretanto, no TCTH a rejeição mais comumente observada é do enxerto contra o paciente. Isto ocorre pois além do paciente receber parte do sistema imunológico sadio do doador este paciente encontra-se inflamado em decorrência do regime de condicionamento recebido durante o pré-TCTH. Dessa forma, o enxerto, parte do sistema imunológico do doador, reconhece os antígenos do paciente e desenvolve uma resposta imunológica alorreativa, clinicamente denominada doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH). Os principais antígenos reconhecidos neste processo inflamatório são os antígenos codificados pelo HLA, descritos anteriormente.

Assim, se o doador e o paciente não compartilham os mesmos antígenos de HLA, as células T do doador irão reagir fortemente contra os antígenos HLA não compatíveis (antígenos principais) do paciente. Além disso, se doador e o paciente são HLA compatíveis mas não gêmeos idênticos, eles continuarão a ter diferenças em muitas proteínas endógenas apresentadas pelas moléculas HLA (antígenos menores) e as células T do doador irão reagir, porém de forma menos intensa, contra estes antígenos menores do paciente (Appelbaum, 2003).

A DECH é classificada como aguda ou crônica e suas manifestações variam de acordo com o curso da doença. A DECH aguda usualmente aparece dentro de algumas semanas pós TCTH e a DECH crônica é caracterizada pela permanência da DECH aguda ou pelo surgimento da doença após 100 dias de TCTH. O tratamento padrão para a DECH é o uso combinado de inibidores de calcineurina, como ciclosporina, com metotrexato. No entanto, mesmo com este tratamento

padrão, aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem um grau severo de DECH necessitando de imunossupressão adicional. Destes pacientes, aproximadamente 50% desenvolvem DECH crônica e necessitam de imunossupressão continuada por muitos anos pós TCTH. A maioria dos pacientes desenvolve tolerância porém, 10 a 20% dos pacientes que se submetem ao TCTH compatível morrem de DECH refratária ou de infecções oportunistas associadas ao tratamento e os níveis de morbimortalidade aumentam ainda mais quando há incompatibilidade de HLA (Riddell, 2007).

Do ponto de vista da biologia celular a DECH pode ser dividida em três fases: Fase I - Efeitos do condicionamento, Fase II - Ativação e expansão das células T do doador e Fase III - Fase efetora da doença (Figura 6). A fase I é uma consequência direta dos efeitos do condicionamento e ocorre antes do TCTH. O condicionamento, como dito anteriormente, é o tratamento químico e/ou radioterápico que tem como finalidade erradicar a doença do paciente e, no caso do TCTH alogeneico, fornecer imunossupressão adequada para evitar a rejeição do enxerto. Por ser um tratamento potente e em altas doses, o condicionamento por si só gera nos pacientes danos teciduais que estimulam seu sistema imunológico a produzir diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), citocinas estas que auxiliam a ativação das células T do doador durante a fase II. Além disso, devido aos danos causados à mucosa intestinal, lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias da flora intestinal são liberados causando a ativação de macrófagos que potencializam a reação alogeneica dos linfócitos T do doador contra os antígenos do paciente (Jaksch e Mattsson, 2005).

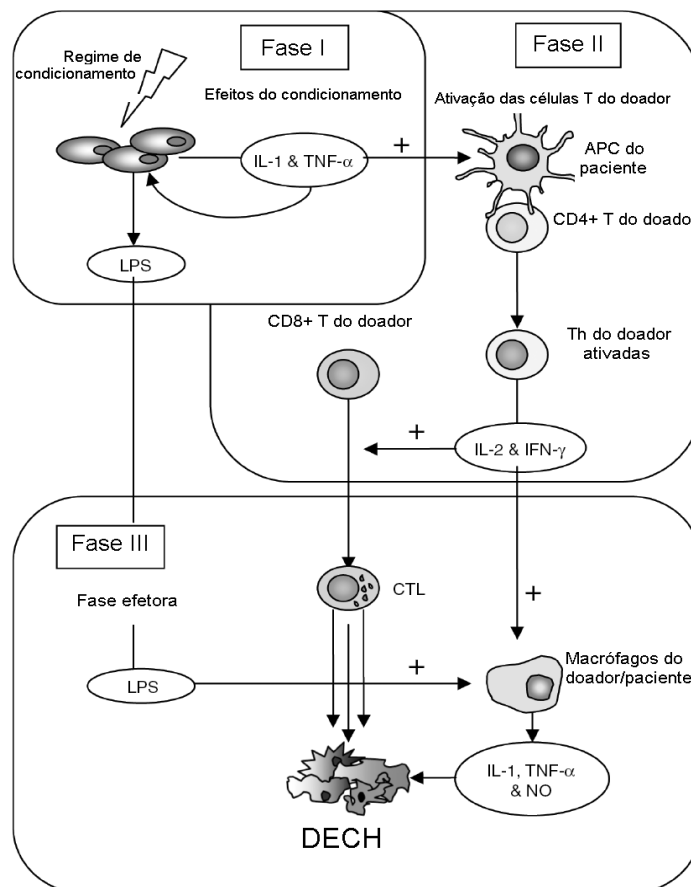
A fase II é caracterizada pela ativação e expansão das células T do doador e ocorre após a interação dos linfócitos T do doador com suas próprias APC e com as

APC do paciente, transpondo a idéia inicial de que nossas células são restritas ao reconhecimento do MHC próprio (Lechler e cols., 1991), (figura 7). A interação da APC do paciente com as células T do doador ocorre como consequência da similaridade entre as estruturas de MHC do paciente e do doador e é conhecida como apresentação direta. Outra forma de apresentação de antígenos do paciente é a apresentação indireta no qual células e/ou restos celulares do paciente são fagocitados tanto pelas APC do paciente quanto pelas APC do doador e alguns fragmentos de peptídeos resultantes desta degradação são apresentados via MHC classe II aos linfócitos T auxiliares ou via apresentação cruzada aos linfócitos T citotóxicos (Shlomchik, 2007).

A consequência direta da fase II é a realimentação do ciclo, como em um *feed-back* positivo, no qual mais citocinas pró-inflamatórias são produzidas como a IL-2 e o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) possibilitando não só a expansão e ativação de novos clones como também a atividade efetora destes linfócitos culminando no início da fase III.

A fase III corresponde à fase efetora da doença e neste estágio os tecidos alvos, principalmente pele, trato gastrointestinal e fígado, são lesados. Diversos mecanismos efetores são acionados dentre eles a citotoxicidade mediada pelos linfócitos T citotóxicos, através da liberação de grânulos de perforina e granzima, e a ativação de apoptose via receptores de morte como Fas/FasL e TNFR1/TNF. Clinicamente esta doença pode tomar grandes dimensões levando à morte do indivíduo ou, na sua forma mais branda, causando *rash* e erupções cutâneas, perda de peso, hemorragias gastrointestinais, inflamações na mucosa causando dor e diarreia, alterações metabólicas do fígado e outros problemas (Jaksch e Mattsson, 2005).

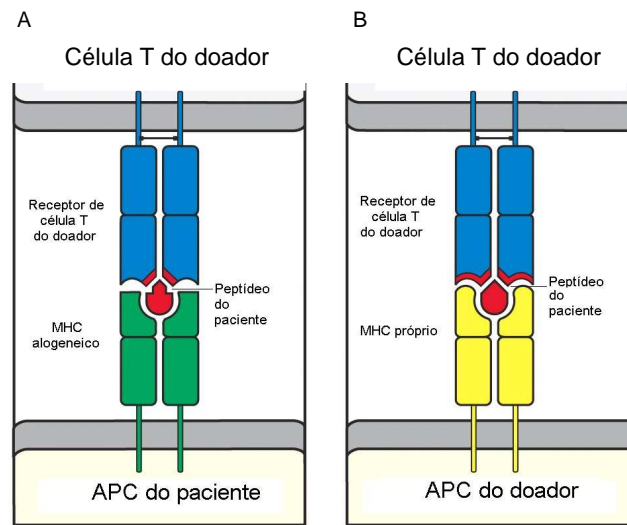
A biologia da DECH crônica assemelha-se as doenças auto-imunes e, embora não seja muito bem compreendida, esta semelhança parece ser consequência direta do envolvimento do timo. Levando-se em consideração que o timo atrofia com o tempo e que durante o TCTH o timo não só é alvo da DECH aguda como também sofre grande toxicidade após o regime de condicionamento, é de se esperar uma diminuição na eficiência tímica pós TCTH, resultando no escape de linfócitos T “autorreativos” pela seleção negativa. Estes linfócitos estão envolvidos na patogênese da DECH crônica (Shlomchik, 2007).



Adaptado de Jaksch M. and Mattsson J., 2005

**Figura 6 – Fases da evolução da DECH aguda**

A DECH aguda é subdividida em três fases contínuas. A fase I, que representa os efeitos do condicionamento; a fase II, que representa a fase de ativação e expansão de células T e a fase III que representa a fase efetora da doença.



Adaptado de Immunobiology, 6ª. Edição

### Figura 7 – Mecanismos de apresentação de antígenos alógenos

Em A os antígenos alógenos do paciente são apresentados as linfócitos T auxiliares do doador via MHC classe II sem restrição ao MHC próprio. Em B observa-se uma apresentação de antígenos clássica no qual os antígenos que estão sendo apresentados foram processados a partir de células e/ou fragmentos celulares do paciente fagocitados pelas APC do doador.

#### 1.1.4.1 Avanços recentes no tratamento da DECH

Com o conhecimento da biologia da DECH e com os avanços na área da imunologia do TCTH pensou-se que, sendo os linfócitos os grandes responsáveis pela DECH, sua retirada poderia diminuir a incidência e/ou gravidade desta doença. De fato a incidência de DECH diminuiu, porém, isso fez emergir problemas anteriormente desconhecidos e a incidência de recaída da doença de base e as rejeições do paciente contra o enxerto aumentaram. Com o passar do tempo ficou claro que os linfócitos presentes no enxerto constituíam um importante componente que não poderia ser eliminado, pelo menos não desta forma (Wagner e cols., 2005). Sua presença é importante por dois motivos: ajudam a eliminar os linfócitos do paciente, diminuindo a rejeição contra o enxerto, e ajudam a eliminar eventuais

clones tumorais que sobreviveram ao tratamento, diminuindo a incidência de recaídas pós TCTH. Hoje, este papel imunomodulador é conhecido como efeito enxerto-contra-tumor (ECT) ou efeito enxerto-contra-leucemia (ECL) e sua importância não só já foi reconhecida como também amplamente utilizada na clínica.

Por conta do balanço existente entre DECH e ECT o grande desafio atual tornou-se diminuir a DECH sem afetar o ECT. As estratégias vão desde imunossupressão global com a administração dos imunossupressores de uso rotineiros como ciclosporina e metotrexato, que embora seja inespecífico é o tratamento padrão, até o uso de imunoterapias menos tóxicas e mais direcionadas como a depleção seletiva de células T virgens, a inserção de genes suicidas em linfócitos, o uso de células NK alorreativas, a transfusão de células T regulatórias e a administração de células tronco mesenquimais (Wanko e Chao, 2005; Bacigalupo, 2007).

## 1.2 Células tronco mesenquimais

A existência de células tronco mesenquimais (CTM) dentro do estroma medular foi inicialmente descrita por Friendenstein e cols. que observaram uma população de células aderentes, semelhante ao fibroblasto e com uma capacidade rudimentar de regenerar tecido ósseo *in vitro* e *in vivo* (Friendenstein e cols., 1966, 1968). Estes estudos foram os primeiros a demonstrar a existência de progenitores multipotentes não hematopoéticos na MO dando origem a tecido osteogênico, revolucionando nosso conceito de nicho hematopoético ao revelar um sistema no qual duas populações de células tronco estariam intimamente relacionadas: as CTH e as CTM.

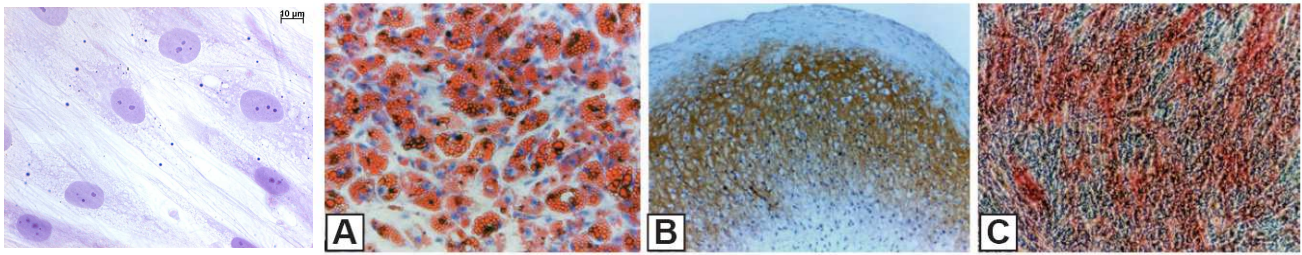


Estudos subseqüentes demonstraram que as CTM isoladas de acordo com o protocolo de Friedenstein são células multipotentes capazes de se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e também mioblastos (Owen e Friendenstein, 1988; Wakitani e cols., 1995, Pittenger e cols., 1999). Outras vias de diferenciação têm sido documentadas como diferenciação neurogênica (Sanchez-Ramos e cols., 2000; Kopen e cols., 1999) e cardiomiogênica, (Makino e cols., 1999) levando-se em conta a superexpressão de marcadores característicos destes tipos celulares porém, sua capacidade de diferenciação nestes subtipos é questionável. Este questionamento surgiu a partir de estudos mostrando que CTM cultivadas *in vitro* podem expressar simultaneamente genes relacionados a múltiplas linhagens, mesmo ao nível de uma única célula. Estas observações colocaram em cheque a validade da expressão gênica e da expressão proteica como ferramentas para a identificação legítima de diferenciação celular (Seshi e cols., 2000, 2003). Além disso, a superexpressão de marcadores pode não significar diferenciação e, neste sentido, a avaliação funcional seria mais fidedigna. Com relação à diferenciação cardiomiogênica, esta avaliação só foi demonstrada em dois de muitos estudos (Li e cols., 2006; Pijnappels e cols., 2006).

Apesar de serem definidas como células tronco, devido à capacidade de diferenciação *in vivo* e *in vitro* e devido à capacidade de proliferação *in vitro*, ainda não está claro se estas células são capazes de regenerar e sustentar um compartimento tecidual pós transplante (Javazon e cols., 2004). A designação das CTM como sendo células tronco foi baseada na extrapolação de características *in vitro* assim, em 2005 um novo termo, células mesenquimais multipotentes do estroma, foi proposto para designar tais células (Horwitz, 2005).

As CTM parecem estar presentes em virtualmente todos os órgãos e tecidos pós-natal (da Silva Meireles e cols., 2006) e, embora grande parte dos trabalhos utilize MO como fonte primária, estas células podem ser expandidas a partir de uma gama de outros tecidos como tecido adiposo, líquido amniótico, tecidos fetais, sangue periférico, sangue de cordão umbilical e endotélio de cordão umbilical. Aparentemente, as CTM derivadas de diferentes fontes compartilham quase ou todas as características entre si incluindo aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, características fenotípicas e potencial de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócito, porém, não está claro se estas células de diferentes origens são a mesma célula ou se a aplicação de técnicas similares de isolamento, cultivo e expansão fazem com que pareçam semelhantes *in vitro* (Javazon e cols., 2004).

O isolamento de CTM a partir de diferentes fontes primárias, associado ao fato de diversos laboratórios utilizarem diferentes metodologias de isolamento e expansão e aliado ao fato das CTM não apresentarem determinantes antigênicos exclusivos isto é, marcadores exclusivos, geraram no meio científico muitos resultados conflitantes e uma dificuldade crescente para comparar os estudos realizados (Horwitz, 2002a). Na tentativa de tornar os resultados mais reprodutíveis e homogêneos entre os laboratórios, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs três critérios mínimos para definir as CTM humanas. Estes critérios são: I - A característica de aderência ao plástico; II - A diferenciação *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Figura 8) e III - A expressão de CD105, CD73 e CD90 paralelamente à ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR (Dominici e cols., 2006).



Adaptado de Pittenger e cols., 1999

**Figura 8 – Potencial de diferenciação das CTM**

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular as CTM devem ser capazes de se diferenciar, sob estímulos apropriados, em adipócitos (A), condroblastos (B) e osteoblastos (C). À esquerda, CTM indiferenciadas com aspecto fibroblastóide.

### 1.2.1 CTM e estimulação alogeneica

As CTM são pouco imunogênicas e parecem escapar do reconhecimento por células alorreativas. Inicialmente pensou-se que isto poderia ser consequência direta da ausência de expressão de MHC de classe II e da baixa expressão de MHC de classe I (Le Blanc e cols., 2003a). No entanto este fenômeno não parece estar relacionado somente a expressão de MHC pois, CTM que expressam MHC de classe I e II, continuam não sendo capazes de estimular a proliferação de linfócitos alogeneico *in vitro* (Potian e cols., 2003). O fato das CTM não expressarem moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD40 e CD40L também contribui para sua baixa imunogeneidade uma vez que, ao entrar em contato com linfócitos T citotóxicos, podem induzir anergia nestes linfócitos fazendo com que a resposta imunológica não se inicie (Tse e cols., 2003).

Embora muitos trabalhos demonstrem sua baixa capacidade de estimular uma resposta alogeneica, alguns estudos utilizando CTM não humanas têm contestado esta condição hipoinmunogênica. Tanto Eliopoulos e cols. como Nauta e cols. observaram que a administração de CTM estimulou o sistema imunológico do

recipiente com a sua conseqüente rejeição (Eliopoulos e cols., 2005; Nauta e cols., 2006a). Além disso, o fato das CTM aumentarem a expressão de MHC de classe I e passarem a expressar MHC de classe II após serem estimuladas com IFN- $\gamma$  tem feito com que sua capacidade de apresentar antígenos seja considerada por muitos autores (Chan e cols., 2006; Stagg e cols., 2006).

Ainda assim as CTM são consideradas como células pouco imunogênicas e isso chamou a atenção para a sua utilização independente da compatibilidade dos genes de MHC. De fato estudos iniciais realizados por Le Blanc e cols. mostraram que as CTM são capazes de modular respostas imunológicas independente do MHC e atualmente, a maioria dos trabalhos utiliza CTM “third-party”, ou seja, incompatível com as células que estão sendo utilizadas como estímulo alogeneico (estimuladores) e incompatível com as células que estão sendo estimuladas (respondedores), no caso de uma cultura mista de leucócitos (Le Blanc e cols., 2003b).

### 1.2.2 Imunomodulação mediada pelas CTM humanas

As primeiras evidências de que as CTM são capazes de modular a resposta imunológica vieram de estudos com CTM humanas e de babuíno, que mostraram a propriedade destas células em inibir a proliferação de linfócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Di Nicola e cols., 2002; Bartholomew e cols., 2002). Desde então o conhecimento obtido cresceu vertiginosamente e hoje sabemos que as CTM interagem com as mais diversas populações do sistema imunológico como linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, linfócitos B, células NK e células dendríticas. No entanto,

o mecanismo pelo qual as CTM atuam continua muito controverso e não consensual.

#### 1.2.2.1 Interação CTM e linfócitos T

A resposta dos linfócitos T é uma seqüência de fases que vai desde a ativação celular, passando pela fase de expansão clonal (proliferação) até a fase efetora. A interação das CTM com os linfócitos T foi estudada em todos estes níveis, porém grande parte dos trabalhos avaliou somente a fase de expansão clonal.

A fase de ativação celular foi estudada por três grupos diferentes. Dois deles observaram uma diminuição das moléculas características de ativação celular CD25, CD38 e CD69 em linfócitos T quando CMN foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) na presença das CTM (Le Blanc e cols., 2004a; Groh e cols., 2005). Entretanto Ramasamy e cols. observaram que as moléculas CD25 e CD69 não foram alteradas nos linfócitos T após CMN terem sido estimuladas com CD3/CD28 na presença das CTM (Ramasamy e cols., 2008).

A fase efetora também foi estudada por poucos grupos e os resultados são também controversos. Tanto Potian e cols. como Angoulvant e cols. observaram uma diminuição da atividade citotóxica em resposta à aloantígenos quando as CTM estavam presentes (Potian e cols., 2003; Angoulvant e cols., 2004). Já Maccario e cols. observaram este mesmo efeito inibitório somente quando as CTM estavam presentes na razão de 1:1 (CMN:CTM), na razão de 1:10 os efeitos foram variáveis, desde inibição à estimulação da citotoxicidade (Maccario e cols., 2005). Utilizando um modelo de ensaio de citotoxicidade parecido, Ramasamy e cols. não observaram diminuição da atividade citotóxica (Ramasamy e cols., 2008). Finalmente, alguns

autores sugerem que a redução da atividade citotóxica pode ser uma consequência indireta da inibição da proliferação dos linfócitos T citotóxicos e, não necessariamente, de uma diminuição na atividade citotóxica em si (Rasmusson e cols, 2003; Maccario e cols., 2005). Cabe lembrar que a metodologia utilizada em todos os casos foi o ensaio de citotoxicidade através da liberação de cromo radioativo, e desta forma, a atividade citotóxica das células NK foi avaliada simultaneamente.

A fase da expansão clonal é sem sombra de dúvidas a mais estudada. As CTM inibem a proliferação de linfócitos estimulados por aloantígenos em cultura mista de leucócitos (CML), por CD3/CD28 e pelos mais diversos tipos de mitógenos como PHA, concavalina A (ConA) e tuberculina (Rasmusson, 2006). Diversos mecanismos de ação têm sido propostos como indução de apoptose (Plumas e cols., 2005) e inibição transiente do ciclo celular (Di Nicola e cols., 2002). A indução de anergia também tem sido observada utilizando-se porém, CTM de camundongos (Zappia e cols., 2005; Glennie e cols., 2005).

Os linfócitos T são uma população de células composta por linfócitos T citotóxicos, que expressam CD8 (T CD8+), e T auxiliares, que expressam CD4 (T CD4+). A principal função dos linfócitos T citotóxicos é atuar na fase efetora da resposta combatendo diretamente as células alvo através por exemplo, da liberação de grânulos de perforina e granzima. Já os linfócitos auxiliares têm como principal função “orquestrar” o sistema imunológico estimulando diferentes tipos de respostas de acordo com o microambiente. Além disso, os linfócitos T auxiliares podem ser classificados em Th1 e Th2 baseado no perfil das citocinas predominantes que eles secretam. O perfil Th1 é caracterizado pela secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2, entre outras citocinas, e o perfil Th2 é caracterizado pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-13, entre

outras. Este perfil de ativação linfocitária conduz o sistema imunológico a reagir de forma distinta dependendo do estímulo assim, um fenótipo Th1 estimula mais a resposta mediada pelos linfócitos T citotóxicos enquanto que o fenótipo Th2 estimula mais a resposta mediada pelos linfócitos B. Novos subtipos linfocitários têm surgido como Th9 e Th17, no entanto ainda não está claro a relevância destes subtipos, principalmente o subtipo Th9, para a resposta imunológica nem o quanto estes subtipos podem ter função redundante sobre os subtipos Th1 e Th2 (Ansel e cols., 2003; Veldhoen e cols., 2008). De posse destes conhecimentos, a interação das CTM com os linfócitos T auxiliares e T citotóxicos foi estudada. Os resultados foram similares entre os grupos e mostraram que as CTM são capazes de inibir a proliferação tanto as células T auxiliares quanto as células T citotóxicas igualmente (Maccario e cols., 2005; Ramasamy e cols., 2008). Já com relação aos fenótipos Th1 e Th2 há apenas dois trabalhos na literatura mostrando que as CTM desviam a resposta Th1 para a resposta Th2 (Aggarwal e cols., 2005; Batten e cols., 2006), (Figura 9).

Dentre os linfócitos T auxiliares e T citotóxicos existem ainda populações de células supressoras, denominadas células T regulatórias. As células T regulatórias parecem ter uma função crítica na supressão da resposta imunológica e diversos trabalhos já demonstraram sua importância na proteção contra doenças auto-imunes (Asano e cols., 1996). Por conta desta característica alguns estudiosos têm especulado uma possível importância destas células no processo mediado pelas CTM. Aggarwal e cols. e Ramasamy e cols. observaram que somente co-cultura de CMN com CTM já é suficiente para induzir aumento de células T  $CD4^+CD25^+$  e aumento de expressão do fator de transcrição Foxp3 em células  $TCD4^+$  respectivamente (Aggarwal e cols., 2005; Ramasamy e cols., 2008). Além disso,

outros estudos mostraram que a proporção de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CTLA4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> aumentaram em CML na presença de CTM (Maccario e cols.; 2005, Selmani e cols.; 2008). No entanto, estes trabalhos não avaliaram se estas células T regulatórias estavam contribuindo para a imunossupressão mediada pelas CTM. Esta funcionalidade foi testada por Prevosto e cols. que demonstraram o potencial das células T regulatórias, tanto CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, obtidas de co-culturas de CTM com CMN, em inibir a proliferação de linfócitos estimulados por células alogeneicas, CD3 ou PHA (Prevosto e cols., 2007).

#### 1.2.2.2 Interação CTM e linfócitos B

Poucas informações a respeito da relação entre linfócitos B e CTM estão disponíveis. Em 2006 Corcione e cols. publicaram dados mostrando que as CTM foram capazes não só de inibir a proliferação de células B como também de aumentar a viabilidade destes linfócitos e de diminuir a produção de anticorpos IgM, IgG e IgA após estes linfócitos terem sido estimulados com CpG 2006, CD40 recombinante, IL-2, IL-4 e anti-Ig na presença das CTM (Corcione e cols., 2006). A capacidade de inibir a proliferação e aumentar a viabilidade foi corroborada por outro estudo em que células B purificadas foram cultivadas com anti-Ig e CpG-C na presença de CTM (Tabera e cols., 2008). Além disso, a capacidade de inibir a produção de anticorpos IgM, IgG e IgA também foi observada em outro estudo em que CMN enriquecidas de linfócitos B foram estimuladas com linfócitos alogeneicos na presença das CTM (Comoli e cols., 2008). Entretanto Rasmusson e cols. utilizando células B enriquecidas e estimuladas com LPS, citomegalovírus ou vírus da varicela-zoster, observaram que em alguns casos as CTM ativavam células B a secretar IgG (Rasmusson e cols., 2007).



### 1.2.2.3 Interação CTM e células NK

A interação das CTM com as células NK tem sido estudada por poucos grupos mas é consenso que as CTM inibem sua proliferação (Krampera e cols., 2006; Sotiropoulou e cols., 2006; Spaggiari e cols., 2006). Porém não consensual têm sido os dados obtidos sobre sua atividade citotóxica em resposta à aloantígenos (vide 1.2.2.1).

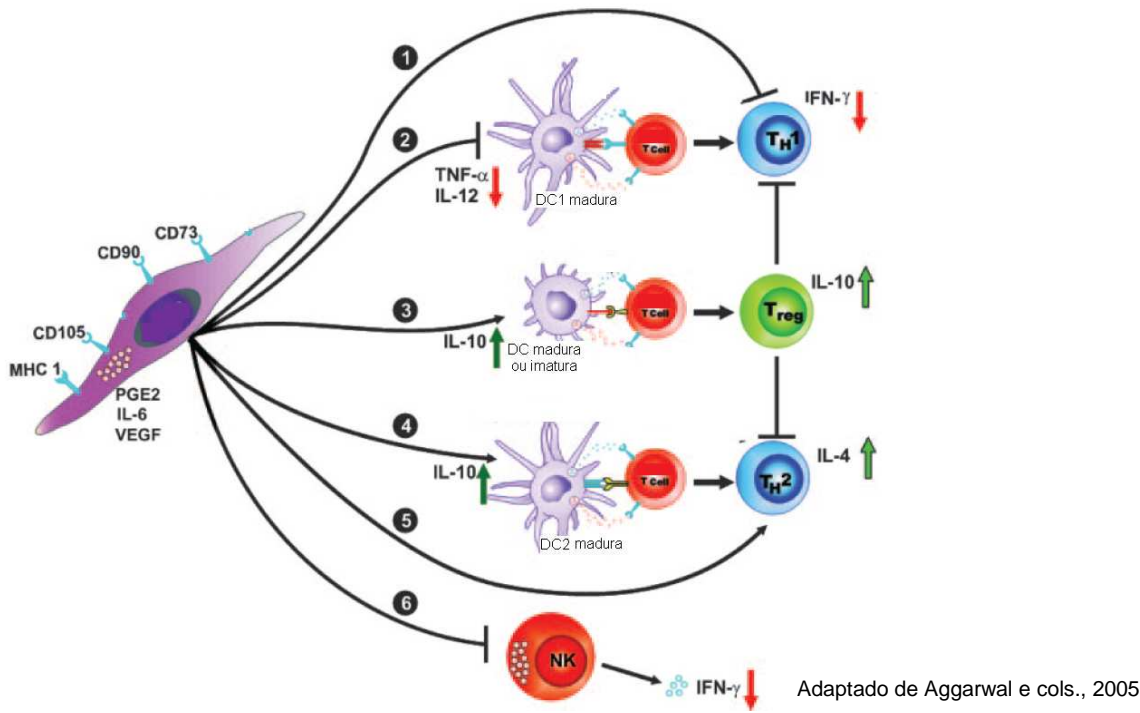
As células NK apresentam atividade citotóxica espontânea contra células que não expressam MHC de classe I ou que expressam MHC de classe I incompatível. Além disso, as CTM utilizadas usualmente nos ensaios de imunomodulação são incompatíveis para o MHC de classe I. Por conta desta característica a atividade citotóxica das células NK contra as CTM foi cogitada por diversos pesquisadores. Embora dois trabalhos não tenham observado citotoxicidade contra as CTM, estudos recentes têm demonstrado que as CTM são alvo das células NK (Rasmusson e cols., 2003; Maccario e cols., 2005; Sotiropoulou e cols., 2006; Spaggiari e cols., 2006). Esta sensibilidade tem sido atribuída à incompatibilidade de MHC de classe I e também à presença de diversos receptores ativadores de células NK como NKG2D e DNAM-1 (Poggi e cols., 2007).

### 1.2.2.4 Interação CTM e células dendríticas

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno (APC) que têm um papel chave nas respostas imunológicas tanto no sentido de aumentá-las quanto no sentido de inibi-las, dependendo do estágio de ativação em que se encontram. Todos os pesquisadores que até o momento se propuseram a estudar esta interação demonstraram que as CTM interferem na diferenciação, maturação e função das

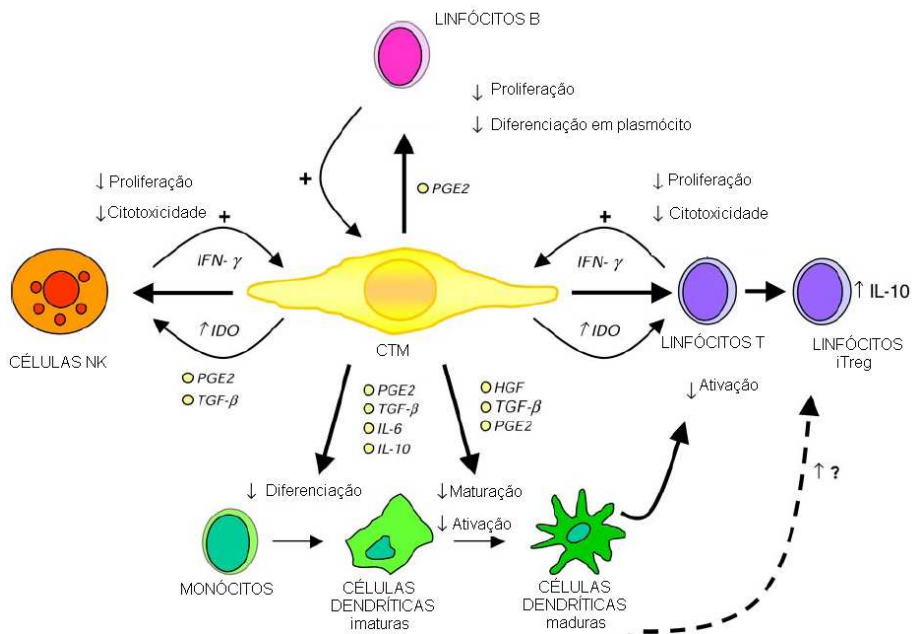
células dendríticas Diversos grupos observaram que as CTM interagem com as células dendríticas mantendo-as num estágio semi-imaturo ou com fenótipo de maturação aberrante, caracterizando uma célula apresentadora de antígeno com propriedades supressivas sobre o sistema imunológico (Zhang e cols., 2004; Beyth e cols., 2005; Jiang e cols., 2005; Nauta e cols., 2006b). Neste sentido Jiang e cols. observaram que a diferenciação de monócitos em células dendríticas foi significativamente inibida pela presença das CTM e que células dendríticas maduras diminuíram a expressão de MHC de classe II e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (Jiang e cols., 2005). Além disso, as células dendríticas, após interação com as CTM, interrompem seu ciclo celular ficando na fase estacionária G0/G1 (Ramasamy e cols., 2007).

Estes trabalhos são importantíssimos pois demonstram que a inibição mediada pelas CTM não é só uma inibição direta, como mostram trabalhos em que CTM são capazes de modular populações linfocitárias enriquecidas sem a necessidade das APC. Esta inibição também envolve uma inibição indireta via modulação das células dendríticas para um fenótipo supressor (figura 10). Ratificando esta idéia Aggarwal e cols. defendem a idéia de que a imunossupressão mediada pelas CTM *in vitro* envolve as principais populações celulares do sistema imunológico. Neste caso, as células dendríticas do tipo 1 diminuiriam a liberação de TNF- $\alpha$ , as células dendríticas tipo 2 aumentariam a liberação de IL-10, os linfócitos Th1 diminuiriam a liberação de IFN- $\gamma$ , os linfócitos Th2 aumentariam a liberação de IL-4, as células NK diminuiriam a liberação de IFN- $\gamma$  e as CTM aumentariam a proporção de células T regulatórias (Aggarwal e cols., 2005) (Figura 9).



**Figura 9 – Mecanismo de imunossupressão proposto por Aggarwal e cols., 2005**

As CTM atuam aumentando o percentual de células T regulatórias, desviando a resposta Th1 para a resposta Th2 e diminuindo a liberação de IFN- $\gamma$  pelas células NK.



**Figura 10 – Mecanismo de ação das CTM sobre o sistema imunológico**

As CTM atuam sobre as mais diversas populações do sistema imunológico interagindo com linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, linfócitos B, células NK, células dendríticas e monócitos.

#### 1.2.2.5 CTM e mecanismo de imunossupressão via fatores solúveis.

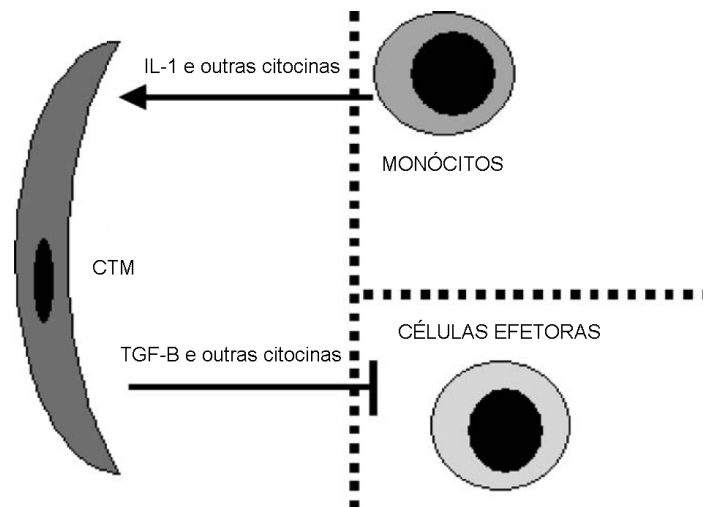
Alguns trabalhos têm demonstrado que a imunossupressão mediada pelas CTM é via fator solúvel uma vez que a inibição continua ocorrendo mesmo quando diferentes tipos celulares do sistema imunológico são separados fisicamente das CTM (Tse e cols., 2003; Groh e cols., 2005; Nauta e cols., 2006b; Corcione e cols., 2006). Interessantemente, sobrenadante de cultura primária de CTM não tem atividade imunossupressora a menos que as CTM tenham sido cultivadas juntamente com CMN (Le Blanc e cols. 2004a; Groh e cols., 2005), sugerindo que estes fatores solúveis não são constitutivamente secretados pelas CTM.

Na tentativa de esclarecer melhor este fenômeno Groh e cols. realizaram co-cultura de CTM com os diferentes subtipos celulares que constituem a fração de CMN e viram que somente o sobrenadante da co-cultura de CTM com monócitos era capaz de inibir a proliferação de linfócitos. Segundo seus resultados os monócitos produzem IL-1 $\beta$  e esta citocina estimula as CTM a secretar TGF- $\beta$  (Groh e cols., 2005) (Figura 11).

Diversas moléculas têm sido descritas como sendo importantes para a imunomodulação mediada pelas CTM. Dentre estas moléculas podemos citar algumas como: fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, HLA-G, Prostaglandina E2 (PGE2), fator inibidor de leucemia e também óxido nítrico, este último descrito em experimentos com CTM não humanas (Djouad e cols., 2007; Nasef e cols., 2007; Nasef e cols., 2008; Sato e cols., 2007). Além disso a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) presente nas CTM também tem sido apontada como importante neste processo por

degradar o triptofano presente no meio de cultura inviabilizando a proliferação dos linfócitos por privação deste aminoácido essencial (Meisel 2004) (Figura 9).

Embora tantas moléculas tenham sido descritas os resultados obtidos pelos diversos pesquisadores são controversos. Enquanto um grupo defende a idéia de que TGF- $\beta$ 1 e HGF são importantes, Le Blanc e cols. e Plumas e cols. falham em reproduzir estes resultados (Di Nicola e cols., 2002; Le Blanc e cols. 2004a; Plumas e cols. 2005). Controversas deste tipo têm sido descritas com freqüência para a enzima IDO (Meisel e cols., 2004; Tse e cols., 2003), para a PGE2 (Aggarwal e cols., 2005; Tse e cols., 2003) e para a IL-10 (Aggarwal e cols., 2005; Tse e cols., 2003). Em 2005 Rasmusson e cols. publicaram dados mostrando que a imunossupressão mediada pelas CTM varia de acordo com o estímulo, o que talvez possa ser uma explicação razoável para tantas controversas descritas na literatura (Rasmusson e cols., 2005). Estes resultados aparentemente contraditórios também podem ser consequência das variações experimentais entre os diferentes grupos de pesquisa que incluem: a espécie e fonte das CTM; o protocolo de isolamento, cultivo e expansão destas células; a utilização de células respondedoras como sendo CMN totais ou populações enriquecidas de diferentes tipos celulares como linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, células B, células NK e células dendríticas e também a metodologia utilizada para análise e o tempo em que as análises foram feitas.



Adaptado de Groh e cols., 2005

**Figura 11 – Mecanismo de imunossupressão proposto por Groh e cols via fatores solúveis**

As CTM após serem estimuladas por IL-1 $\beta$  produzem TGF- $\beta$ , que é uma das citocinas responsáveis pela capacidade supressiva das CTM. Toda esta interação ocorre via fatores solúveis e sem a necessidade de contato célula-célula.

### 1.2.3 Fisiologia das CTM

O papel fisiológico das CTM ainda não está claro mas a hipótese atual é que a presença destas células no adulto é necessária para a manutenção da homeostase do indivíduo através do seu papel ativo na regeneração tecidual e no reparo em resposta à injúrias e/ou doenças, característica esta que define todas as células tronco adultas. Evidências interessantes que suportam esta hipótese vieram de estudos *in vivo* que mostraram a mobilização das CTM para o sangue periférico em condições de injúria tecidual. Neste sentido Mansilla e cols. descreveram um aumento de CTM no sangue de pacientes com queimadura corporal aguda quando comparado com doadores saudáveis, este aumento correlacionava-se diretamente com o grau de queimadura do paciente (Mansilla e cols., 2006). Outro estudo

interessante mostrou uma redução no número de CTM circulantes uma semana após pacientes terem sofrido infarto agudo do miocárdio sugerindo que as CTM foram recrutadas para o miocárdio lesado (Wang e cols., 2006). A migração de CTM da circulação para tecidos lesados foi relatada em diversos estudos (Chen e cols., 2001; Horwitz e cols., 2002b e Ortiz e cols., 2003) e, tão importante quanto isto, estes mesmos estudos mostraram que as CTM foram recrutadas somente para os locais lesados. Estas evidências sugerem que traumas e/ou injúrias teciduais podem recrutar as CTM para o local afetado e que este possa ser o grande papel fisiológico destas células, atuar na regeneração e/ou reparo tecidual.

As CTM residem dentre tantos lugares na MO e, portanto é de se esperar que estas células exerçam algum papel fisiológico neste sítio. Desta forma, outra hipótese é a sua importância fisiológica para a manutenção do nicho hematopoético. Vários trabalhos têm demonstrado que as CTM interagem intimamente com células hematopoéticas auxiliando a formação de plaquetas por megacariócitos (Cheng e cols., 2000), a diferenciação de linfócitos B (Kierney e Dorshkind, 1987) e a linfopoiese de células T (Barda-Saad e cols., 1996). Embora não esteja claro como ocorrem estas interações parte do mecanismo pode ser através da secreção de vastas quantidades de moléculas que dão suporte à hematopoese como fibronectina, osteopontina, trombospondina e a quimiocina CXCL12 (Pedemonte e cols., 2007). Além disso as CTM são ricas fontes de citocinas promotoras da hematopoese como IL-6, -7, -11, -14, -15, M-CSF e LIF, o que parece contribuir para este fenômeno (Deans e cols., 2000).

O potencial imunossupressor das CTM como sendo uma de suas características fisiológicas ainda não está claro pois, para observarmos este efeito altas concentrações de CTM são necessárias e fisiologicamente, estas células estão

presentes em baixas concentrações nos diversos tecidos. No entanto, após seu recrutamento para o tecido alvo sua concentração local aumenta e desta forma este papel imunossupressor pode ser fisiologicamente viável *in vivo*.

Caso isto seja verdade podemos imaginar que estas células possam ter um papel fundamental no microambiente da medula óssea, não só por dar suporte à hematopoese, como também por criar um sítio imunoprivilegiado onde as CTH estariam protegidas de respostas imunológicas locais indesejáveis. Uma observação que talvez suporte isso é que pacientes com anemia aplástica apresentam uma diminuição do potencial imunossupressivo das CTM quando comparado com doadores saudáveis, levando-nos a evidências de que um desequilíbrio na função imunorregulatória das CTM pode estar relacionado à patogênese de doenças autoimunes (Bacigalupo, 2005).

Outra possível importância destas células seria na interface materno-fetal. O feto, por ser um indivíduo semi-alogeneico, estimula na mãe uma resposta imunológica e para que a gravidez tenha sucesso, diversos mecanismos periféricos que controlam esta resposta imunológica são utilizados. O fato das CTM poderem ser isoladas a partir de fluidos amnióticos, sangue de cordão umbilical, sangue fetal e outros tecidos associados ao feto pode ser uma evidência da importância destas células na manutenção da tolerância fetal. No entanto, o papel das CTM na manutenção do imunoprivilégio na interface materno-fetal continua uma hipótese ainda a ser testada.



#### 1.2.4 CTM e terapias

*“For more than 100 years, aspirin has served as one of the most effective anti-inflammatory, fever-fighting, pain-relieving drugs on the market. However, its mechanism of action was not discovered until 1971, more than 70 years after aspirin had first appeared on the market. This, however, has not prevented their applications in the clinical setting if there are benefits for patients and there are no or minimal side effects. This type of scenario will probably occur also for cell therapy based on MSCs.” (Extraído de Giordano e cols., 2007)*

O potencial terapêutico das CTM começou a ser utilizado aproximadamente duas décadas após as descobertas de Friedenstein quando empresas de biotecnologia começaram a explorar este potencial (Bianco e cols., 2006). A versatilidade destas células associada ao seu potencial terapêutico fez com que sua utilização na clínica ocorresse ainda que os mecanismos de ação não fossem muito bem compreendidos. Embora inicialmente o foco das atenções tenha sido sua utilização em terapias para regeneração tecidual, com o aumento da compreensão da biologia destas células ficou claro que as mesmas poderiam ser úteis em duas outras áreas: terapias gênicas e imunoterapias.

##### 1.2.4.1 CTM e terapias de regeneração tecidual

Por conta da sua capacidade de proliferação e diferenciação pensou-se que tais células poderiam ser úteis para a regeneração tecidual de forma análoga ao tratamento de doenças hematológicas com CTH (Horwitz, 2002a). Assim, desordens do tecido ósseo como osteogenesis imperfecta, injúrias teciduais no miocárdio como infarto agudo, injúrias no sistema nervoso como traumas na medula espinhal e

injúrias no estroma medular como o condicionamento pós TCTH poderiam ser tratados através de uma nova terapia celular.

De fato inúmeros trabalhos em modelos animais e até mesmo ensaios pré-clínicos mostraram uma melhora embora o mecanismo de ação, inicialmente pensado como diferenciação, não tenha sido observado em muitos estudos (Yu e cols., 2006; Togel e cols., 2005). Atualmente existem três mecanismos de ação propostos: I – diferenciação, II – efeito parácrino e III – fusão. A diferenciação consiste na migração das CTM para o órgão lesado com a sua conseqüente diferenciação estimulada pelo microambiente local (Kopen e cols., 1999), o efeito parácrino consiste na migração das CTM para o órgão lesado com a conseqüente liberação de fatores solúveis bioativos (Gnecchi e cols., 2005; Kinnaird e cols., 2004) e a fusão consiste na fusão das CTM com as células lesadas (Spees e cols., 2003; 2006). O mecanismo exato de ação desta célula ainda não é bem compreendido mas talvez todos estes mecanismos sejam operacionais podendo ou não ocorrer simultaneamente.

#### 1.2.4.2 CTM e terapias gênicas

As CTM são facilmente transduzidas por diversos tipos de vetores podendo ser veículos para transfecções gênicas de curto e/ou longo prazo. Assim, estas células podem funcionar como “fábricas” produtoras e secretoras de proteínas para fins terapêuticos, como o fator VIII para o tratamento de hemofilias. Vislumbrando um futuro, talvez não muito distante, CTM de pacientes portadores de hemofilia poderiam ser transduzidas e devolvidas ao paciente assim, estas células poderiam

“repor” o fator VIII de forma endógena, sem a necessidade de administração exógena de fator VIII recombinante.

O tropismo das CTM para sítios de injúria e/ou trauma tecidual chamou a atenção para a sua utilização em outra área da medicina, a área oncológica. Como o microambiente de tumores sólidos assemelha-se bastante ao microambiente de um tecido injuriado, CTM geneticamente modificadas poderiam ser úteis como veículos celulares carreadores de drogas antitumorais (Kucerova e cols., 2007).

#### 1.2.4.3 CTM e imunoterapias

O potencial imunossupressor das CTM abriu a possibilidade para sua utilização terapêutica em diversas situações patológica nas quais a ativação indesejada do sistema imunológico causa prejuízos ao paciente e, embora o mecanismo pelo qual as CTM diminuem a resposta imunológica ainda seja controverso, seu potencial imunomodulatório já tem sido explorado em diversos *clinical trials*. Dentre os diversos estudos em andamento chamam a atenção os estudos para o tratamento de doenças autoimunes (Zappia e cols., 2005) e da DECH (Vide 1.2.5.2).

#### 1.2.5 CTM e TCTH

O fato das CTM auxiliarem a hematopoese, serem pouco imunogênicas e apresentarem atividade imunossupressora fez com que sua aplicabilidade no TCTH tivesse uma importância ímpar, tornando-a promissora para terapia celular nesta área.

Inicialmente as CTM ganharam atenção devido à especulação de uma possível importância destas células no microambiente da MO. Como o estroma da MO provavelmente deriva das CTM, há um grande interesse em sua utilização como terapia coadjuvante ao TCTH, pois após altas doses de quimio e/ou radioterapia, o estroma da MO encontra-se danificado e comprometido. Assim, a infusão de CTM poderia diminuir o período de aplasia pós-transplante ao facilitar a reconstituição medular e aumentar a hematopoese. Mais recentemente, com a descoberta do seu potencial imunossupressor estas células passaram a ter outra aplicabilidade para o TCTH: uma nova terapia imunossupressora para a contenção e/ou prevenção da DECH (Figura 12).

Além disso, a baixa imunogeneidade das CTM, observada principalmente em estudos de infusão de única dose, poderia ser útil na medida em que não seria necessária uma alta compatibilidade dos genes de HLA como pré-requisito para o TCTH alogeneico. Isso ampliaria o leque de doadores disponíveis, tornando factível a modalidade de transplante atualmente conhecida como infusão “third-party”, ou seja, infusão de CTM de um segundo doador, uma “terceira parte” em um transplante alogeneico.

#### 1.2.5.1 CTM e reconstituição hematopoética

A primeira evidência da capacidade das CTM humanas em promover pega e reconstituição medular veio de um *clinical trial* em 32 pacientes portadores de câncer de mama submetidos a quimioterapia em altas doses seguida de TCTH autólogo (Koç e cols., 2000). Neste trabalho os autores observaram que a pega de neutrófilos ocorreu mais rapidamente nos pacientes que receberam a infusão de CTM do que

nos controles históricos. Desde então diversos outros estudos, tanto em modelos animais quanto em humanos, têm demonstrado o efeito benéfico desta terapia (Bensidhoum e cols., 2004; Le Blanc e cols., 2007; Ball e cols., 2007).

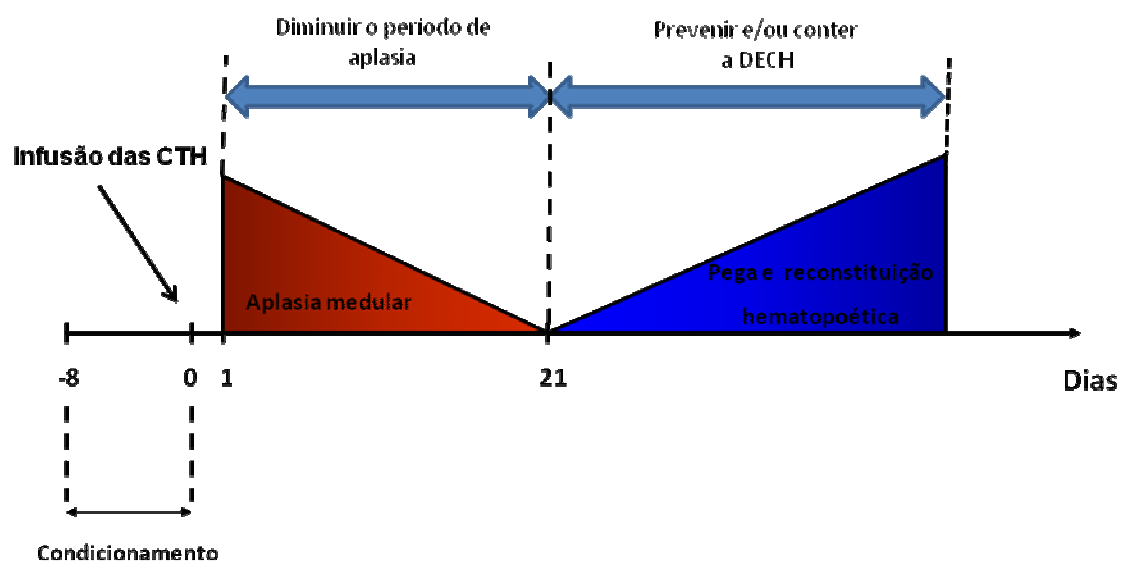
#### 1.2.5.2 CTM e contenção da DECH.

O primeiro relato clínico da eficiência do uso de CTM para a contenção da DECH foi feito em 2004 pelo Karolinska Transplant Centre que, com êxito, trataram um menino de 9 anos que sofria de DECH aguda grau IV refratária a esteróides (Le Blanc e cols., 2004b).

Se observarmos com cautela os resultados obtidos desde 2004, podemos ver que grande parte dos trabalhos que obtiveram sucesso com esta terapia utilizou a infusão das CTM após a DECH já ter se estabelecido no paciente (Le Blanc e cols., 2004b; Ringdén e cols., 2006; Fang e cols., 2007 e Ball e cols., 2008). A administração de CTM como medida profilática, no D0 do TCTH, tem sido menos estudada e mais controversa, enquanto Lazarus e cols. não observaram melhora na DECH, Ning e cols. observaram uma melhora significativa (Lazarus e cols., 2005; Ning e cols., 2008). Com o intuito de compreender melhor o tempo ideal de infusão Polchert e cols. avaliaram em modelo animal a capacidade das CTM em prevenir e tratar a DECH através da infusão em diferentes tempos (D0, D2, D20 e D30). Os resultados obtidos mostraram que as CTM só foram capazes de aumentar as taxas de sobrevida quando administradas nos dias D2 e D20. Interessantemente, quando as células T, efectoras da DECH, vinham de camundongos *knock-out* para o IFN- $\gamma$  as CTM não eram capazes de afetar a sobrevida do animal independente do tempo de infusão. Isto sugere que para as CTM atuarem de forma supressiva elas precisam

estar em um ambiente inflamatório promovido pela presença do IFN- $\gamma$  e este ambiente ocorreu nos dias D2 e D20. Outra evidência disto é que CTM tratadas com IFN- $\gamma$  têm atividade terapêutica quando administradas no dia do TCTH (D0) (Polchert e cols., 2008).

O mecanismo de ação das CTM, embora não totalmente esclarecido, resulta em imunossupressão global. Isto dificulta sua utilização clínica em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas pois aumenta as chances da doença de base recair (Ning e cols., 2008). Desta forma, estudos que avaliam o tempo ideal de infusão serão fundamentais para o sucesso desta terapia nos pacientes com risco de recaída.



**Figura 12 – Possíveis intervenções terapêuticas das CTM no TCTH**

As CTM têm uma dupla importância para o TCTH: Diminuir o período de aplasia facilitando a reconstituição hematopoética e prevenir e/ou conter a DECH.

## 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O desenvolvimento de protocolos clínicos concretos que utilizam CTM ainda necessita de mais conhecimento a respeito de sua biologia básica e da padronização das preparações celulares para a terapia. Assim, uma melhor compreensão da imunossupressão *in vitro* mediada pelas CTM poderá nos proporcionar os conhecimentos necessários para o uso mais racional e apropriado do seu potencial terapêutico, possibilitando o desenvolvimento de uma terapia celular de grande aplicabilidade para o TCTH.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Estudar a propriedade imunomodulatória das CTM *in vitro* sobre células mononucleares (CMN) de doadores de banco sangue buscando identificar possíveis mecanismos de ação envolvidos neste processo.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se as CTM são imunogênicas;
- Avaliar se as CTM apresentam atividade imunossupressora sobre CMN estimuladas com CMN alogeneicas;
- Determinar quais subtipos de linfócitos são susceptíveis a modulação pelas CTM;
- Correlacionar a importância dos fatores solúveis neste mecanismo;
- Avaliar a relevância da interação entre CTM e monócitos para a imunossupressão;
- Comparar o fenótipo de ativação linfocitária na presença e na ausência de CTM.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

As concentrações de uso bem como as especificações dos reagentes utilizados estão detalhadas nos itens 4.1, 4.1.1 e 4.1.2.

### 4.1 Reagentes [concentração de uso]

PBS - pH 7.4 (1X) → 8 gramas de cloreto de Sódio (NaCl), 0,2 gramas de cloreto de potássio (KCl), 1,5 gramas de fosfato de sódio monobásico ( $\text{Na}^2\text{HPO}^4$ ) e 0,2 gramas de fosfato de potássio dibásico ( $\text{KH}^2\text{PO}^4$ ) em um litro de água Milli-Q;

Meio Hank's – Sigma-Aldrich;

Meio RPMI 1640\* – Invitrogen;

Meio DMEN de baixa glicose\*\* –Invitrogen;

SBF – HyClone;

L-glutamina [200mM] –Invitrogen;

Penicilina G [10.000 unidades/mL] e streptomicina [10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] – Invitrogen;

CFSE [10.000 $\mu\text{M}$ ] – Molecular Probes - Invitrogen; Tripsina [0,05%] –Invitrogen;

Histopaque® 1077 – Sigma-Aldrich;

Filtros de policarbonato com poros de 0.4  $\mu\text{m}$  - transwell – Corning;

Meio RPMI completo – RPMI 1640\* suplementado com 10% de SBF, L-glutamina 2mM, penicilina 50 unidades/mL e streptomicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

Meio DMEN completo – DMEN\*\* suplementado com 10% de SBF, L-glutamina 2mM, penicilina 50 unidades/mL e streptomicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 4.1.1 Reagentes para análise por citometria de fluxo

Anticorpos monoclonais Anti-CD3 PerCP, Anti-CD4 FITC, Anti-CD8 PE, Anti-CD14 FITC e PE, Anti-CD16 PE, Anti-CD19 PE, Anti-CD56 PE e Controles isotípicos FITC, PE e PerCP, todos da Becton Dickinson;

Corante de viabilidade celular 7AAD – Becton Dickinson;

Solução de PBS com paraformaldeído (PBS-FORMOL) a 2% – Merck.

#### 4.1.2 Reagentes para análise por PCR em tempo real

Trizol – Invitrogen;

Clorofórmio – Merck;

Isopropanol – Merck;

Água tratada com dietil-pirocarbonato (Água DEPC) a 0,1% – Sigma-Aldrich;

Tampão DNase [10x] (200 mM Tris-HCl, pH 8.4; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl) – Invitrogen;

Enzima (DNase) [1U/μL] – Invitrogen;

EDTA [25mM], pH8.0 – Invitrogen;

Solução de Água DEPC com etanol a 75% – Merck;

Tampão *First-strand* [5x] (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>) – Invitrogen;

DTT [0,1M] – Invitrogen;

OligodT18 [500μg/mL] – IDT;

Mistura de dNTP [10 mM] – Invitrogen;

Enzima (Inibidor de RNase) [40U/μL] – Invitrogen;

Enzima (Transcriptase reversa SuperScript II) [200U/μL] – Invitrogen;

Power SYBR Green PCR Master Mix [2X] – Applied Biosystems.

## 4.2 Culturas de células

### 4.2.1 Amostras Biológicas

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de aspirado de medula óssea (MO) de doadores do Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea e amostras de sangue periférico (SP) de doadores do Banco de Sangue. Este projeto contou com aprovação dos comitês de ética e de pesquisa do Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro.

### 4.2.2 Separação de células mononucleares

SP e MO foram diluídos em meio Hank's na proporção de 1:1. Posteriormente, em tubos falcon de 15ml, 3 ml de Histopaque® foram adicionados e depois a amostra biológica (SP ou MO) foi acrescentada lentamente até atingir a marca de 13ml. As amostras foram centrifugadas a 300g por 25 minutos a uma temperatura constante de 25°C. Após a centrifugação o anel de células mononucleares (CMN) pode ser observado imediatamente acima do ficoll. Este anel foi recolhido e transferido para outro tubo falcon. As células foram lavadas 1x com meio Hank's e centrifugadas a 300g por 5 minutos. As CMN provenientes de SP foram mantidas em meio RPMI completo na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL e as CMN da MO foram ressuspensas em meio DMEN completo num volume final de 1mL para cada 2mL de MO processada.

#### 4.2.3 Cultura primária de CTM

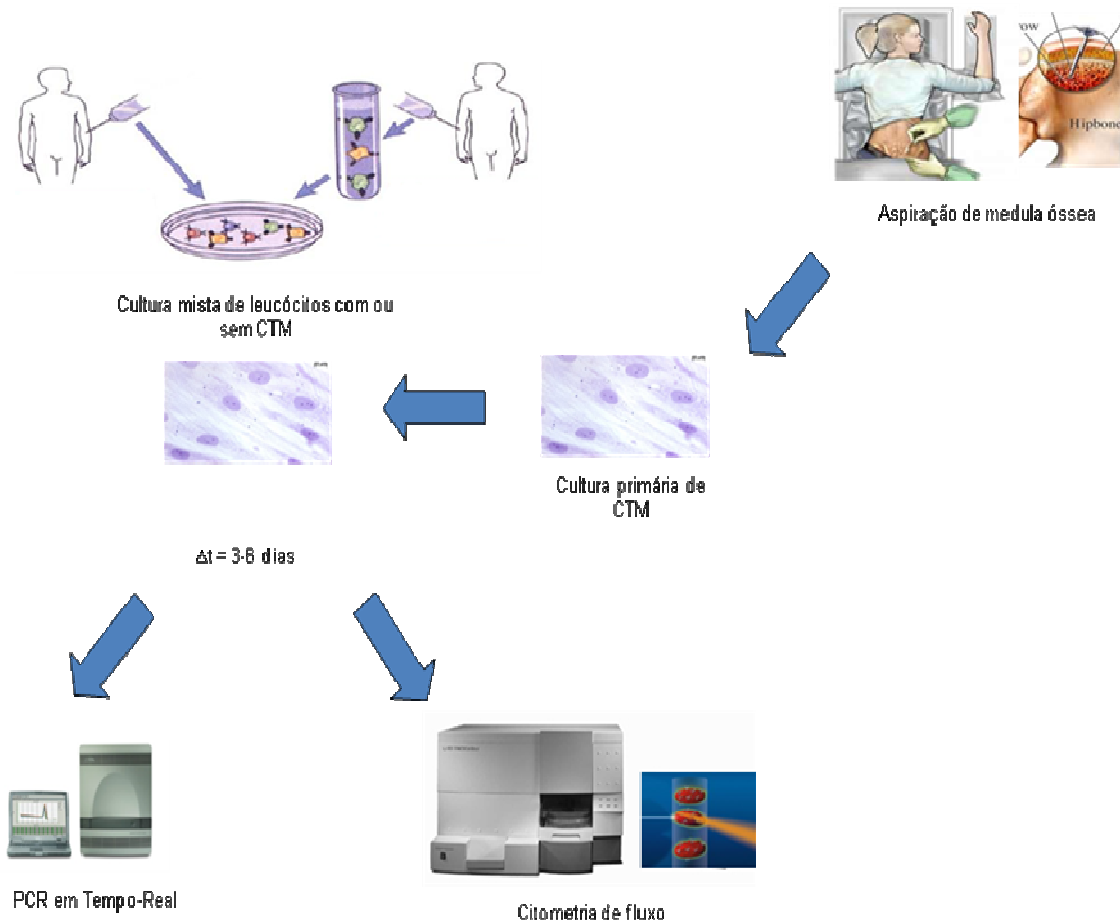
Após serem processadas segundo o protocolo 4.2.2, CMN derivadas de MO foram plaqueadas na concentração de  $2,0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Após 48 horas as células não aderentes foram retiradas e as células aderidas foram mantidas em cultura até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Atingida a confluência as CTM foram tripsinizadas por 3 minutos a 37°C, transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Após a centrifugação as CTM foram lavadas 1x com meio Hank's, ressuspendidas em meio DMEN completo e plaqueadas na concentração de 4000 células/cm<sup>2</sup>. As células foram cultivadas rotineiramente a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> utilizando-se meio DMEM completo. Estas células foram mantidas em cultura trocando-se metade do meio 2x por semana até atingirem a passagem 3 ou 4. Neste momento as CTM estavam prontas para serem utilizadas nos experimentos. No dia do experimento, CTM foram tripsinizadas por 3 minutos a 37°C, transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Após a centrifugação as CTM foram lavadas 1x com meio Hank's, centrifugadas a 300g por 5 minutos, ressuspendidas na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI completo e utilizadas no experimento.

#### 4.2.4 Culturas mistas de leucócitos (CML)

A CML consiste na estimulação de CMN com CMN alogeneicas. Após serem processadas segundo o protocolo 4.2.2, CMN derivadas de SP de dois doadores distintos foram denominadas de CMN estimuladoras (CMNe) ou CMN respondedoras (CMNr). As CMNe foram irradiadas a 2500 cGy e, para os experimentos cujo objetivo fosse avaliar a proliferação, as CMNr foram marcadas

com CFSE na concentração final de 2,5  $\mu\text{M}$  por 5 minutos a temperatura ambiente e a marcação foi interrompida adicionando-se 5% de SBF. Ambas as células, CMNe e CMNr, foram lavadas 1x com meio Hank's, centrifugadas a 300g por 5 minutos e ressuspensas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml em meio RPMI completo. As culturas foram feitas em placas de 24 poços adicionando-se  $5 \times 10^5$  CMNr e  $5 \times 10^5$  CMNe na presença ou ausência de  $5 \times 10^4$  CTM (10% CTM) num volume final de 1000 $\mu\text{l}$ . As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 3 ou 6 dias e posteriormente analisadas por citometria de fluxo ou PCR em Tempo-Real (Figura 13). Em alguns casos foram utilizadas placas de 96, 12 e 6 poços, respeitando-se sempre a razão entre a área da placa, o número de células plaqueadas e o volume final de meio.

Além disso, dependendo do objetivo do ensaio as CTM foram separadas fisicamente da CML através de transwell ou foram utilizados sobrenadantes de cultura primária de CTM o invés da CTM. Outra modificação da CML foi utilizar, em alguns experimentos, CTM como células estimuladoras ao invés de CMN alogeneicas.



**Figura 13– Estratégia metodológica padrão de análise dos experimentos**

CML foram feitas na presença ou ausência de CTM. Após 3 ou 6 dias as culturas foram interrompidas e analisadas por citometria de fluxo ou PCR em tempo-Real. Dependendo do objetivo do ensaio algumas modificações na CML foram realizadas.

### 4.3 Metodologias de análise

#### 4.3.1 Citometria de fluxo

Todos os experimentos foram adquiridos no citômetro FACScan® da BD e as análises foram feitas utilizando-se o software Paint a Gate®.

#### 4.3.1.1 Análise de proliferação de linfócitos alorreativos por CFSE

Para a análise da proliferação linfocitária CML foram incubadas por 6 dias. Após o término do período de incubação  $5 \times 10^5$  células foram lavadas 1x com PBS 1X a temperatura ambiente e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram fixadas com PBS-Formol e adquiridas. Caso fosse de interesse avaliar as subpopulações que estavam proliferando as células eram marcadas com os anticorpos de interesse antes da fixação (Vide 4.3.1.2).

#### 4.3.1.2 Análise da frequência de populações celulares por imunofenotipagem

Para a quantificação de algumas populações celulares CML foram incubadas por 3 ou 6 dias. Ao final  $5 \times 10^5$  células foram lavadas 1x com PBS 1X a temperatura ambiente e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células eram marcadas com anticorpos monoclonais por 15 minutos, lavadas novamente com PBS e fixadas com PBS-Formol.

#### 4.3.1.3 Análise da viabilidade celular por marcação com 7AAD

Caso o objetivo fosse analisar a viabilidade, após a marcação com os anticorpos de interesse as células eram marcadas com 7AAD por mais 20 minutos. Após este período as células eram ressuspensas diretamente em PBS 1X, sem lavagem, e imediatamente adquiridas.

### 4.3.2 PCR em Tempo-Real

#### 4.3.2.1 Extração de RNA total

CML foram incubadas por 3 ou 6 dias e ao final do período  $5 \times 10^5$  ou  $10^6$  células foram lavadas 1x com PBS 1X a temperatura ambiente e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1mL de Trizol, homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Os homogeneizados foram transferidos para tubos estéreis de 1,5 mL e centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa de cada extração foi transferida para novos tubos. A estes tubos 0,5 mL de Isopropanol foram adicionados seguido de uma incubação de 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C e os RNAs obtidos lavados com etanol gelado 75%. Depois da lavagem, os precipitados foram novamente centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C sendo finalmente ressuspensos em 50µL de água DEPC. Após extração todos os RNAs foram quantificados no Biophotometer® (Eppendorf) e estocados a -70°C até o uso.

#### 4.3.2.2 Purificação dos RNAs (Reação de DNase)

Para eliminar as possíveis contaminações com DNA, os RNAs obtidos foram submetidos a reação de digestão com DNase. Para isso 1µg de cada RNA foi incubado com 1µL de tampão DNase e 1µL de DNase, ajustando o volume final



para 9  $\mu\text{L}$  com água DEPC . Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se 1  $\mu\text{L}$  de EDTA, totalizando um volume de 10  $\mu\text{L}$  para cada reação. As reações foram incubadas a 65°C por 10 minutos na máquina de PCR MyCycler BioRad.

#### 4.3.2.3 Transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada adicionando-se à reação de DNase 4 $\mu\text{L}$  de tampão *First-strand* 5x, 2  $\mu\text{L}$  de DTT, 1  $\mu\text{L}$  de OligodT18, 1  $\mu\text{L}$  de mistura de dNTP, 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase e 1  $\mu\text{L}$  da enzima transcriptase reversa. Totalizando um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . As reações foram incubadas a 42°C com posterior incubação de 70°C por 15 min.

#### 4.3.2.4 Elaboração dos *primers*

Os *primers* foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do *Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR* e com o auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da IDT (*Integrated DNA Technologies* - [www.idt.org](http://www.idt.org)). As seqüências dos RNAs mensageiros (mRNAs) foram obtidas no banco de dados do genoma humano ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)). Na tabela 1 estão discriminados os *primers* utilizados.

Genes analisados	Nº acesso	5' – primer – 3'
$\beta$ -Actina	NM_001101.3	F – CGCCAACACAGTGCTGTCT R – CACGGAGTACTTGCGCTCAG
T-bet	NM_013351.1	F – TGC CTA CCA GAA TGC CGA G R – GAA TTG ACA GTT GGG TCC AGG
GATA3	NM_001002295.1 ou 002051.2	F – CGG CTT CGG ATG CAA GTC R – GGT AGT GTC CCG TGC CAT C
RORyt	NM_005060.3 ou 001001523.1	F – GAC TCA TCG CCA AAG CAT CCT G R – AGC GGC TTG GAC CAC GAT
Foxp3	NM_001114377.1 ou 014009.3	F – GGT ACA GTC TCT GGA GCA GC R – AGA TGA AGC CTT GGT CAG TG

**Tabela 1 – Primers utilizados para análise por PCR em tempo real.** Os *primers*, senso (F) e antisenso (R) foram elaborados a partir dos mRNAs obtidos através do número de acesso (NM\_) dos genes em questão no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

#### 4.3.2.5 Análise do fenótipo de ativação linfocitária por PCR em Tempo-Real

As análises da expressão gênica diferencial em PCR Tempo-Real foram realizadas em 20  $\mu$ L com *Power SYBR Green PCR Master Mix 1X*, 10 ng de cDNA e 0,5  $\mu$ M de cada *primer*. Essas reações foram realizadas em triplicatas para cada condição experimental. As reações para análise em *Real-Time* PCR foram submetidas à incubação inicial à 50°C por 2 minutos no termociclador (Corbet RG6000 Qiagen) seguidos por uma incubação de 95°C por 10 minutos e por 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1minuto.

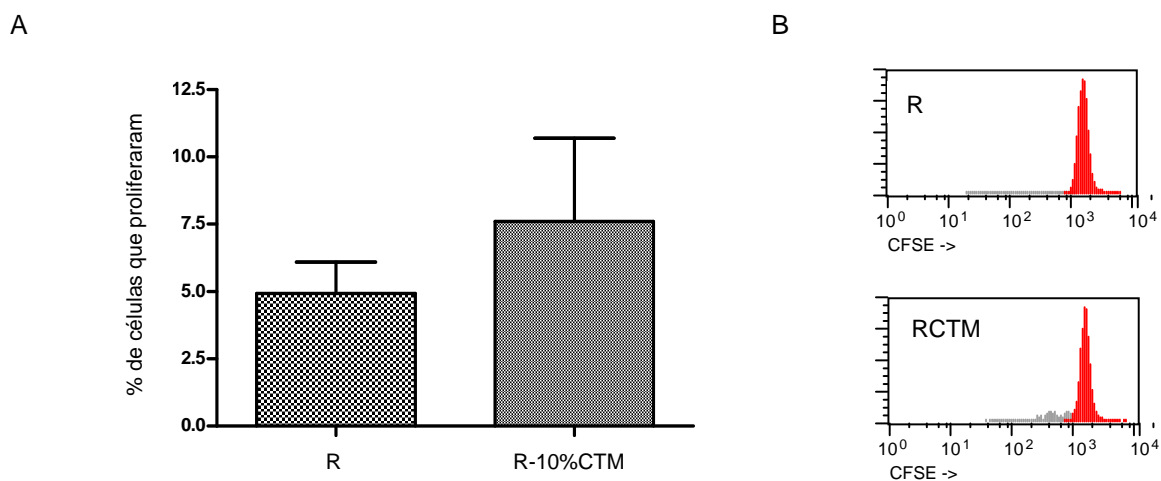
#### 4.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism 4.02® (GraphPad Software Inc.). Os testes utilizados foram teste *t* de *Student* ou *One-way* ANOVA. Foram considerados estatisticamente significativos experimentos cujo *P Value* foi menor que 0.05 após a análise de, no mínimo, três experimentos independentes. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CTM alogeneicas não estimulam a proliferação de linfócitos

Diversos trabalhos têm demonstrado que as CTM são pouco imunogênicas pois quando utilizadas como estímulo alogeneico não estimulam a proliferação de linfócitos. Desta forma este experimento inicial buscou avaliar o potencial imunogênico das CTM estabelecidas no CEMO e, como pode ser observado na figura 14, as CTM não estimularam a proliferação de linfócitos de forma significativa (n=10).



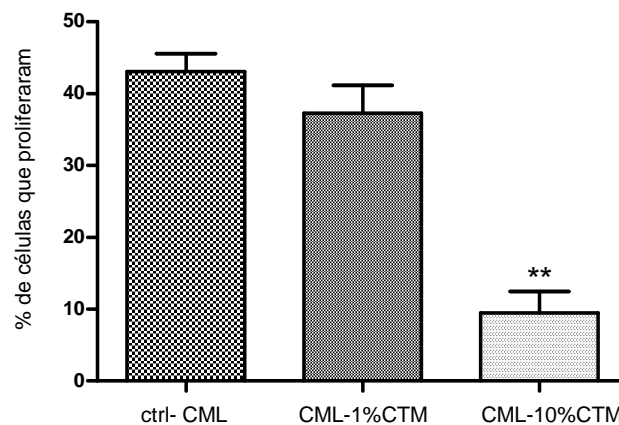
**Figura 14 – CTM alogeneicas não estimulam a proliferação de linfócitos**

A. A proliferação de linfócitos foi avaliada em culturas de células mononucleares na ausência (R) ou presença de 10% de CTM alogeneicas (R-10%CTM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para dez experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). B. Ensaio representativo de um experimento. Os histogramas mostram o pico parental em vermelho e as múltiplas gerações de células que proliferaram em cinza.

## 5.2 As CTM inibem a proliferação linfocitária

Como discutido anteriormente (Vide 1.2.1), as CTM são capazes de modular as respostas imunológicas independente do MHC e, sendo assim, utilizamos para os ensaios de imunomodulação CTM “third-party” ou seja, incompatíveis com as células respondedoras e com as células estimuladoras.

As CTM foram capazes de inibir a proliferação dos linfócitos embora, na menor concentração, o efeito tenha sido menos consistente (n=12). Em alguns experimentos 1% de CTM estimulou ao invés de inibir a cultura mista de leucócitos (CML) (Figura 15). Assim, utilizamos para os experimentos subseqüentes 10% de CTM.

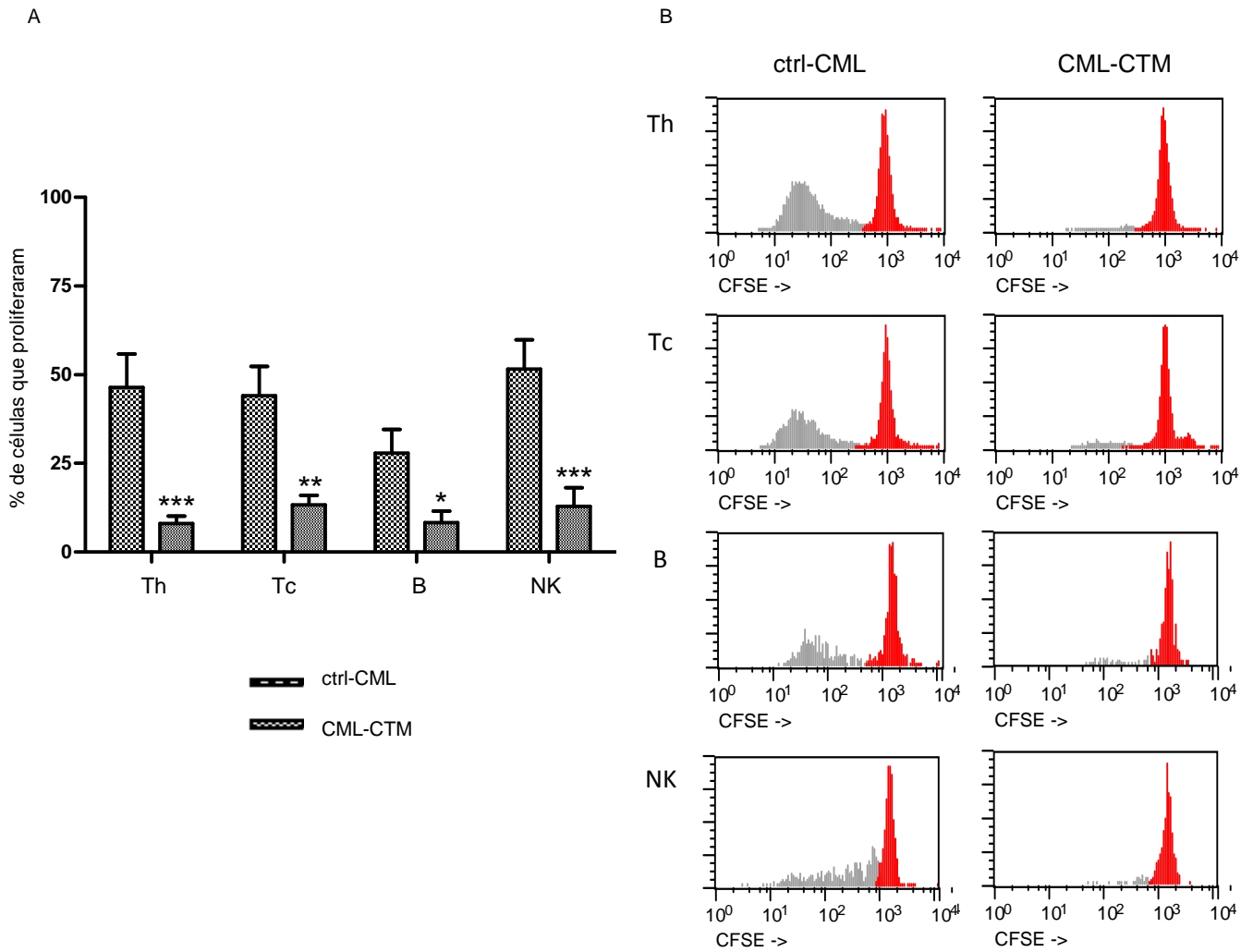


**Figura 15 – CTM inibem a proliferação de linfócitos**

A proliferação de linfócitos foi avaliada em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de diferentes concentrações de CTM (CML-1%CTM e CML-10%CTM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para doze experimentos independentes (\*\*p<0,01). Não houve diferença estatisticamente significativa entre ctrl-CML e CML-1%CTM (p>0,05).

### 5.3 As CTM inibem a proliferação de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, células B e células NK

Uma vez que o sistema imunológico é composto por uma população heterogênea de células nós nos perguntamos quais tipos celulares tinham sua proliferação inibida pelas CTM. Neste sentido, utilizamos para a identificação das populações celulares dupla marcação de CD3+/CD4+ para os linfócitos T auxiliares (Th), CD3+/CD8+ para os linfócitos T citotóxicos (Tc), CD3-/CD56+ para as células NK (NK), e CD3-/CD19+ pra os linfócitos B (B). Como pode ser visto na figura 16 as CTM inibem a proliferação de todos os subtipos estudados com diferentes níveis de significância (n=4).

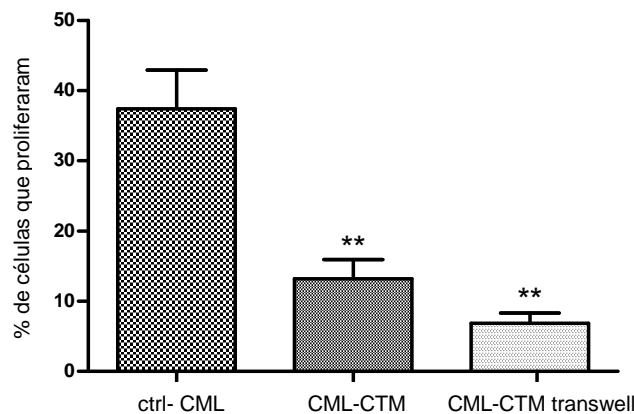


**Figura 16 – CTM inibem a proliferação de linfócitos Th, Tc, B e NK**

A. A proliferação de linfócitos foi avaliada em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM (CML-CTM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para quatro experimentos independentes (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). B. Ensaio representativo de um experimento. Os histogramas mostram o pico parental em vermelho e as múltiplas gerações de células que proliferaram em cinza.

#### 5.4 As CTM inibem a proliferação de linfócitos independente do contato

Grande parte da comunicação celular entre as células do sistema imunológico é mediada por fatores solúveis, através da liberação de citocinas, quimiocinas e outras substâncias. Dessa forma, um ponto crucial a ser analisado é o quanto a presença de fatores solúveis está envolvida na imunossupressão mediada pelas CTM. Com este intuito realizamos CML na presença de CTM, separadas ou não por membrana de policarbonato (transwell). Esta membrana permite a troca de fatores solúveis sem que ocorra o contato célula-célula. Como observado na figura 17, a inibição mediada pelas CTM é independente do contato (n=5).

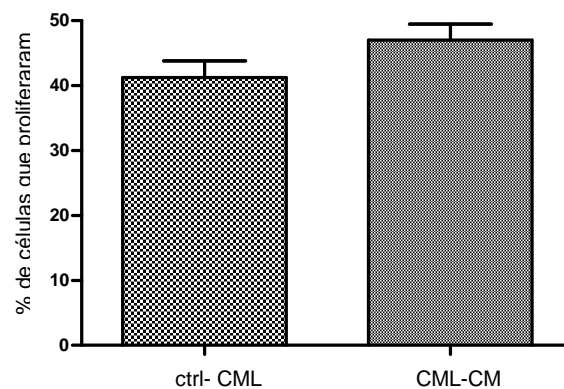


**Figura 17 – As CTM inibem a proliferação de linfócitos independente do contato**

A proliferação de linfócitos foi avaliada em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM com ou sem contato físico (CML-CTM e CML-CTM transwell) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para cinco experimentos independentes (\*\*p<0,01).

### 5.5 Meio condicionado de CTM não inibe a proliferação de linfócitos

Como as CTM inibem a proliferação de linfócitos independente do contato, isso nos levou a crer que esta imunomodulação se deve a fatores solúveis secretados. Sendo assim, nos perguntamos o quanto estes fatores solúveis são constitutivamente secretados pelas CTM e, para testar esta hipótese, realizamos CML com meio condicionado (CM) por 48 horas de cultura primária de CTM ao invés de adicionarmos as CTM. Como mostrado na figura 18, o meio condicionado não foi capaz de inibir a proliferação dos linfócitos (n=5).



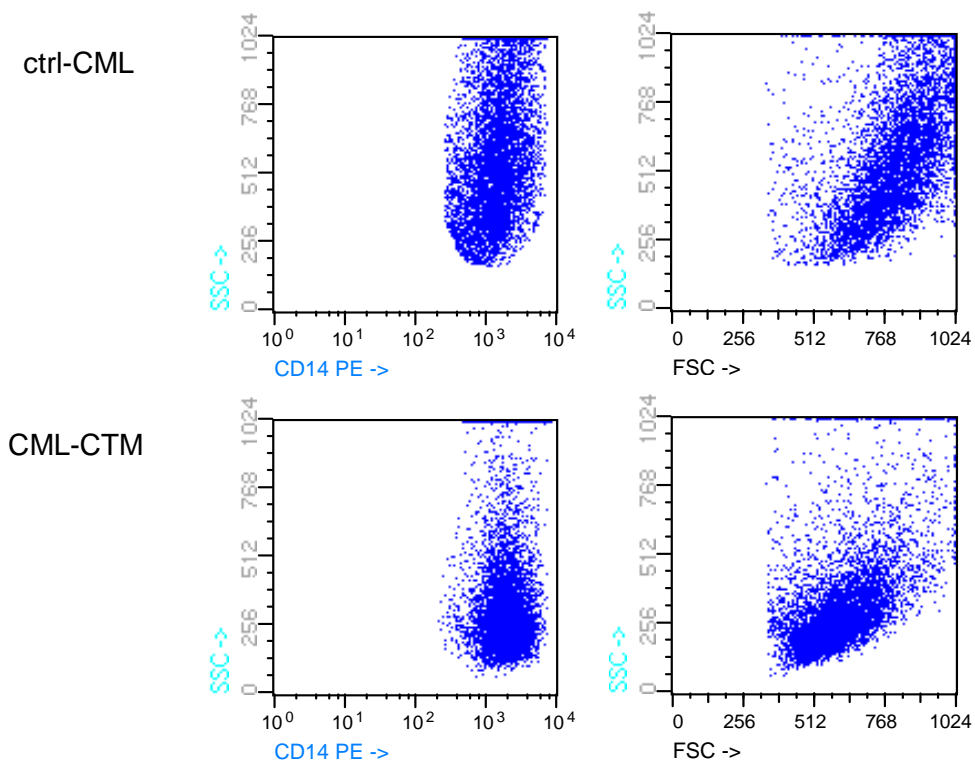
**Figura 18 – Meio condicionado de CTM não inibe a proliferação de linfócitos**

A proliferação de linfócitos foi avaliada em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de meio condicionado de cultura primária de CTM (CML-CM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para cinco experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).



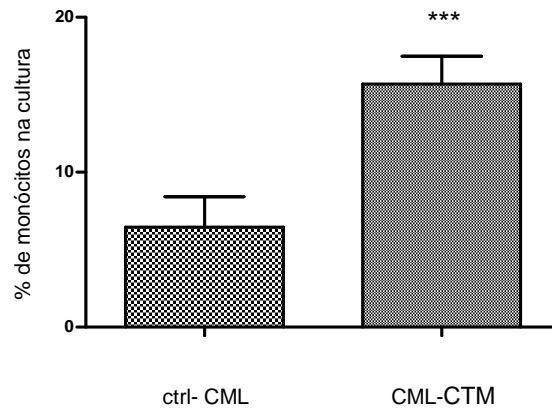
## 5.6 As CTM aumentam o percentual de monócitos e parecem alterar sua morfologia

Uma observação inesperada nestes experimentos foi a constatação de que os monócitos das CML na presença das CTM, identificados pela expressão de CD14, apresentaram uma morfologia mais homogênea, com um menor tamanho e uma menor granulosidade, quando comparado com os monócitos das CML controle (Figura 19, n=9). Esta aparente alteração da morfologia também foi acompanhada de um aumento no percentual de monócitos nas culturas com CTM (Figura 20, n=9).



**Figura 19 – Análise por citometria de fluxo sugere alteração morfológica dos monócitos induzida pelas CTM**

Os monócitos foram avaliados em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM (CML-CTM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Experimento representativo de nove experimentos independentes.

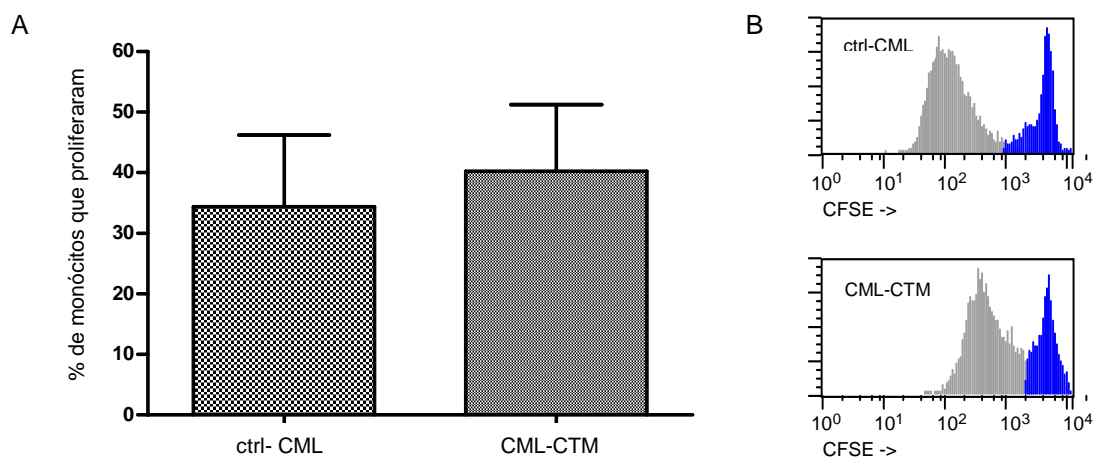


**Figura 20 – O percentual de monócitos aumenta em CML na presença de CTM**

O percentual de monócitos (CD14+) foi avaliado em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM (CML-CTM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para nove experimentos independentes ( $p < 0,001$ ).

### 5.7 O aumento no percentual de monócitos não se deve à proliferação

O aumento no percentual de monócitos pode ter ocorrido por dois motivos: proliferação ou aumento da viabilidade. Com o intuito de esclarecer o mecanismo avaliamos a proliferação destes monócitos em CML com ou sem CTM. Como pode ser observada na figura 21, a proliferação de monócitos não difere significativamente entre os grupos (n=4).

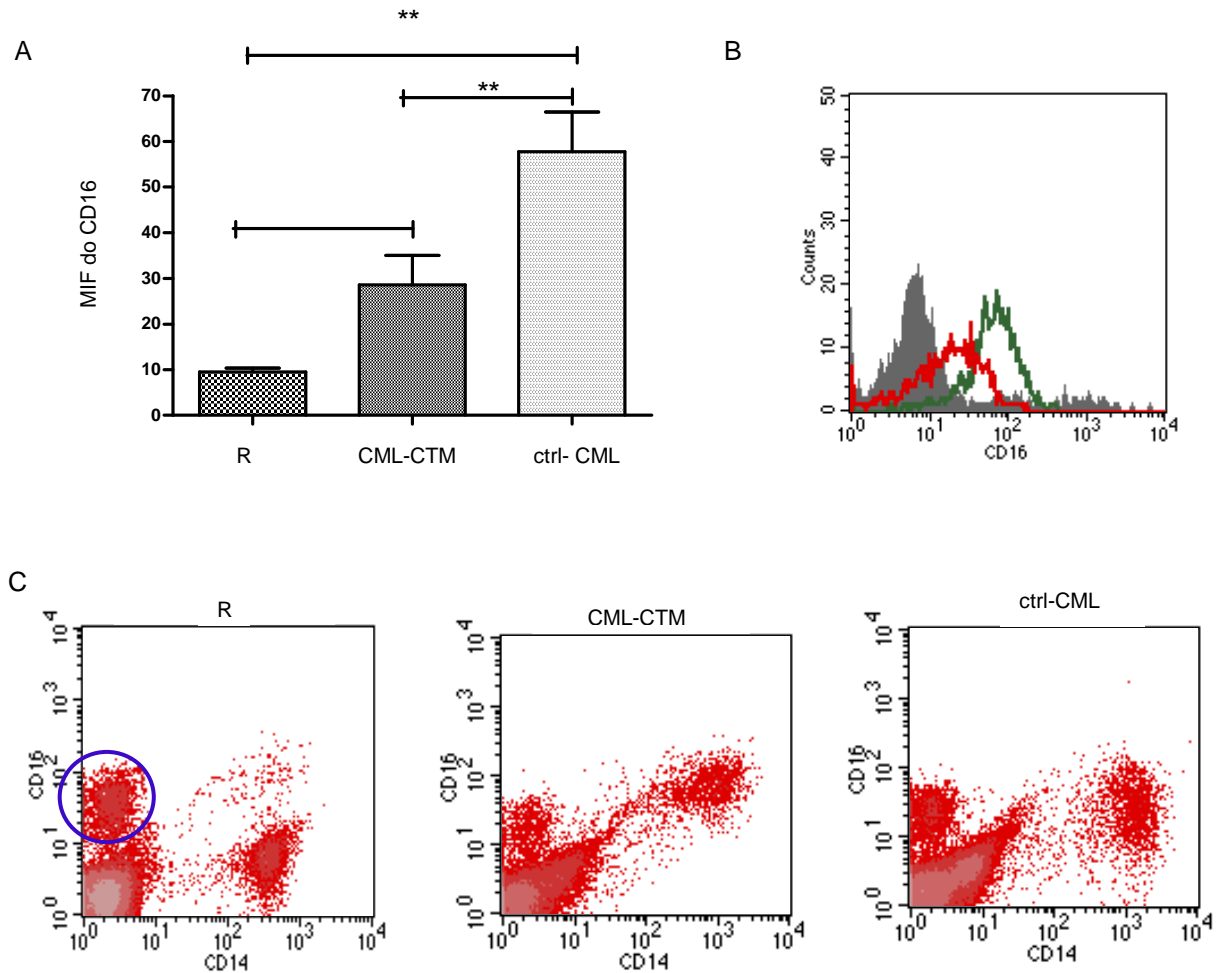


**Figura 21 – O aumento no percentual de monócitos não se deve a proliferação.**

A. A proliferação de monócitos foi avaliada em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM (CML-CTM) após 6 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas e CFSE+. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para quatro experimentos independentes. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). B. Ensaio representativo de um experimento. Os histogramas mostram o pico parental em azul e as múltiplas gerações de células que proliferaram em cinza.

### 5.8 As CTM impedem a aquisição do CD16 pelos monócitos

De posse de alguns estudos publicados na literatura (Grage-Griebenow e cols., 2001; Gordon e Taylor, 2005; Tacke e Randolph, 2006; Strauss-Ayali e cols., 2007) e das nossas observações sobre o comportamento dos monócitos frente às CTM, nós levantamos a hipótese de que as CTM modulam a frequência dos monócitos em CML mantendo-os com o fenótipo supressor (CD14+CD16-) ao invés do fenótipo inflamatório (CD14+CD16+). Para testar esta hipótese realizamos CML na ausência ou presença de CTM, separadas por membrana de transwell, e avaliamos a expressão do CD16 nos monócitos após 3 dias de cultura. Como pode ser observado na figura 22, os resultados corroboram nossa hipótese mostrando que as CTM impedem que os monócitos adquiram a expressão do CD16 (n=4).

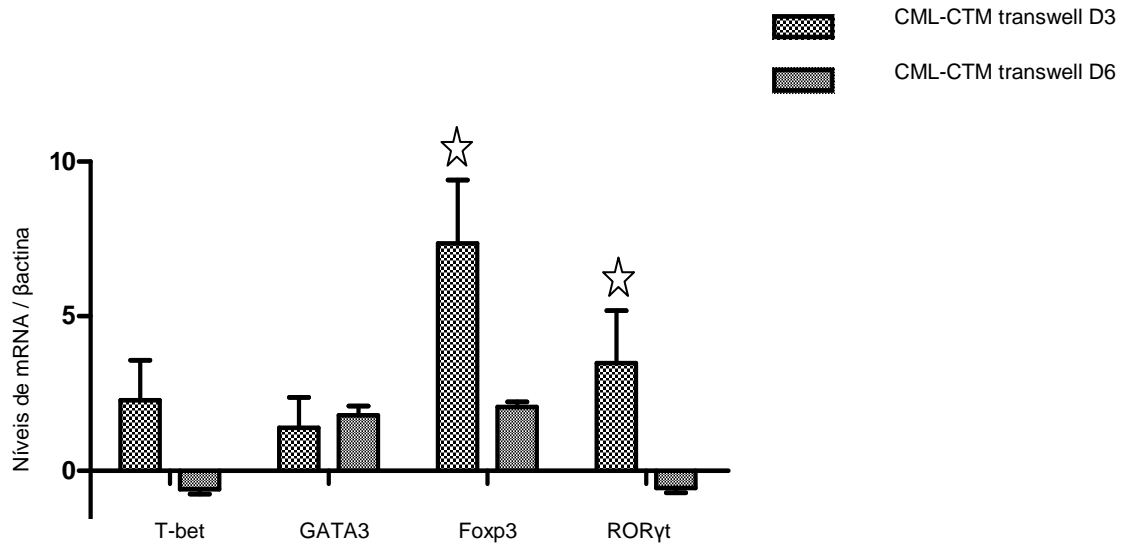


**Figura 22 – As CTM impedem a aquisição do CD16 pelos monócitos**

A média de intensidade de fluorescência (MIF) do CD16 em monócitos foi avaliada nas CMNr antes de colocá-las em cultura (R) e em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM separadas por transwell (CML-CTM) após 3 dias de incubação. A análise foi feita dentro da região de células vivas. A. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para quatro experimentos independentes ( $p > 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ). B. Overlay de um experimento representativo mostrando a intensidade do CD16 na população de monócitos. Em cinza R, em vermelho CML-CTM e em verde CML. C. Dot-Plot mostrando a intensidade do CD16 na população de monócitos utilizando como referência a intensidade de CD16 nas células NK (circuladas em azul).

### 5.9 As CTM alteram os níveis de mRNA dos fatores de transcrição que regulam as populações de células T auxiliares: Th1, Th2, Th17 e T regulatória induzida (iTreg)

Com o objetivo de compreender se as CTM alteram o fenótipo de ativação linfocitária, realizamos CML na ausência e presença de CTM e, após 3 e 6 dias de cultura, analisamos os fatores de transcrição característicos das subpopulações: T-bet para Th1, GATA3 para Th2, ROR $\gamma$ t para Th17 e Foxp3 para iTreg. Para evitar contaminação com mRNA das CTM optamos por realizar estes experimentos sem o contato célula-célula, utilizando para isso membranas de transwell. Como pode ser visto na figura 23, os níveis de mRNA de todos os fatores de transcrição estavam aumentados nas CML com CTM no D3. No D6 ocorreu tanto aumento (GATA3 e Foxp3) quanto diminuição (T-bet e ROR $\gamma$ t). Embora estas alterações tenham sido observadas, somente os fatores de transcrição ROR $\gamma$ t e Foxp3 no D3 apresentaram alterações significativas. Os níveis de mRNA para ROR $\gamma$ t aumentaram em média 3.48 vezes e os níveis de mRNA de Foxp3 aumentaram em média 7.36 vezes com desvio padrão de respectivamente 2.94 e 3.55.



**Figura 23 – As CTM alteram o nível de mRNA dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, Foxp3 e ROR $\gamma$ t**

Os fatores de transcrição foram avaliados em CML na ausência (ctrl-CML) ou presença de 10% de CTM, separadas por membrana de transwell (CML-CTM), após 3 e 6 dias de incubação (D3/D6). As expressões dos fatores de transcrição na ctrl-CML correspondem ao valor 1 e foram normalizados contra os níveis do mRNA da  $\beta$  actina. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão para três experimentos independentes. Diferenças são consideradas significativas quando há uma variação de no mínimo duas vezes nos níveis de mRNA (☆).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Cultura mista de leucócitos como modelo proposto para estudar a modulação mediada pelas CTM

Segundo dados de Rasmusson e cols., as CTM parecem modular a resposta imunológica por diferentes mecanismos, dependendo do estímulo recebido. De acordo com seus experimentos, em culturas de linfócitos estimulados com PHA e inibidos com CTM, a concentração de IL-2 diminuiu enquanto as concentrações de IL-2R solúvel e IL-10 continuaram inalteradas. Entretanto, em CML tratadas com CTM as concentrações de IL-2, IL-2R e IL-10 aumentaram. Além disso, a adição de indometacina, inibidor da síntese de PGE<sub>2</sub>, reverteu somente a inibição dos linfócitos estimulados com PHA. Estas evidências fizeram com que o grupo sugerisse que o mecanismo de imunossupressão mediado pelas CTM varia dependendo do estímulo (Rasmusson e cols., 2005). Como nosso objetivo é compreender o mecanismo de imunossupressão exercido pelas CTM em pacientes que as receberam após desenvolverem DECH, optamos por estimular nossas culturas com células alogeneicas, ensaio conhecido como cultura mista de leucócitos (CML). A utilização de células alogeneicas como estímulo mimetiza melhor a reação imunológica alogeneica que ocorre nos pacientes com DECH e pode nos levar a uma compreensão mais fiel do processo.

Muitos trabalhos utilizaram como células respondedoras e/ou células estimuladoras populações enriquecidas de linfócitos B (Corcione e cols., 2006; Comoli e cols., 2008; Rasmusson e cols., 2007; Tabera e cols., 2008), linfócitos T (Aggarwal e cols., 2005; Tabera e cols., 2008), células NK (Aggarwal e cols., 2005;



Spaggiari e cols., 2006; Sotiropoulou e cols., 2006), células dendríticas (Zhang e cols., 2004; Aggarwal e cols., 2005; Beyth e cols., 2005; Jiang e cols., 2005; Nauta e cols., 2006b) e monócitos (Groh e cols., 2005). No entanto, as células que compõem o sistema imunológico agem em conjunto e desta forma, fragmentá-las para estudar sua interação com as CTM separadamente, embora possa nos trazer informações úteis, faz com que percamos a relação da CTM com todas as populações simultaneamente. Cabe lembrar que *in vivo*, a interação de uma população com as CTM pode influenciar na interação de outra população com as CTM, como num efeito cascata. Sendo assim, optamos por estimular células mononucleares com células mononucleares alogeneicas, preservando a maior parte das populações que compõem o sistema imunológico.

Grande parte dos trabalhos que avaliou o potencial imunossupressor das CTM utilizou a técnica de Timidina triciada (Bartholomew e cols., 2002; Potian e cols., 2003; Tse e cols., 2003; Le Blanc e cols., 2003a, 2003b; Plumas e cols., 2005; Aggarwal e cols., 2005; Rasmusson e cols., 2005; Beyth e cols., 2005; Corcione e cols., 2006; Ramasamy e cols., 2007; Ramasamy e cols., 2008). Esta técnica é uma das metodologias tradicionais mais empregadas para avaliar a proliferação celular e, embora amplamente utilizada, não permite distinguir quais células estão proliferando em sistemas de co-culturas. Desta forma, a solução encontrada por estes grupos foi utilizar CTM irradiadas ou fixadas, inviabilizando a proliferação das CTM mas mantendo-as vivas de forma a não impedir sua atividade biológica. A metodologia utilizada por nós neste trabalho (CFSE) é capaz de distinguir uma célula da outra e, portanto, não é necessário fixar ou irradiar as CTM. Além disso, as CTM empregadas clinicamente não são submetidas a tratamentos que impeçam sua

proliferação e sendo assim, a metodologia por CFSE pode contribuir para aproximar mais o modelo *in vitro* do fenômeno de imunossupressão observado *in vivo*.

Assim, nosso modelo proposto é uma tentativa de aproximar ao máximo nosso experimento *in vitro* das condições observadas *in vivo* utilizando para tanto, CML na presença ou ausência de CTM não fixadas e não irradiadas.

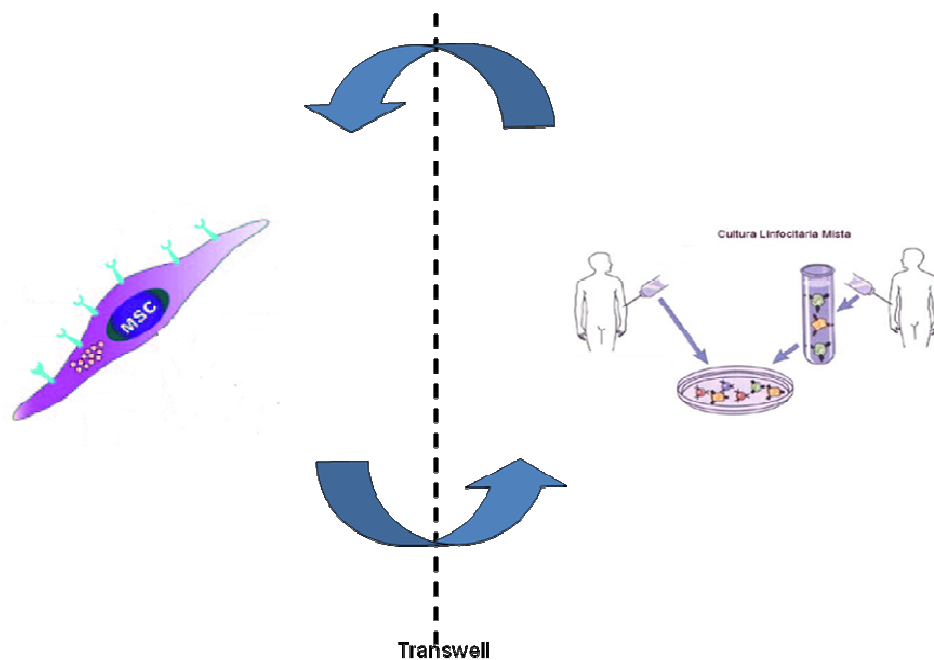
## 6.2 Status de imunoprivilegiadas

Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado que as CTM são pouco imunogênicas, no entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que as CTM são reconhecidas pelo sistema imunológico (Le Blanc e cols., 2003a; Potian e cols., 2003; Eliopoulos e cols., 2005; Nauta e cols., 2006a) Desta forma, nosso experimento inicial foi observar se as CTM estabelecidas por nós apresentavam potencial imunogênico. Nossos resultados mostraram que as CTM não estimulam a proliferação de linfócitos de forma significativa embora seja possível observar uma tendência à proliferação. Além disso, observamos que as CTM inibiam de forma significativa somente na dose de 10%. Quando as mesmas estavam presentes na concentração de 1%, algumas culturas tiveram sua proliferação estimulada ao invés de inibida. Este fenômeno, que também já foi observado por outros grupos (Le Blanc, 2003b; Fang L, 2006), sugere que a propriedade imunossupressora das CTM talvez só ocorra quando sua capacidade de inibir o sistema imunológico se sobreponha ao seu potencial estimulatório.

### 6.3 Inibição da proliferação de linfócitos pelas CTM

A imunomodulação mediada pelas CTM tem sido estudada por diversos pesquisadores desde 2002 e, embora grande parte deste trabalho tenha sido uma padronização de experimentos já realizados por outros grupos, nós utilizamos um modelo mais próximo das reações alogeneicas observadas *in vivo*, pelas razões explicitadas anteriormente (Vide 6.1). Nossos dados corroboram com a literatura ao mostrar que as CTM inibem a proliferação de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, células NK e linfócitos B, embora a inibição dos linfócitos B seja mais controversa (Rasmusson e cols., 2007).

Utilizando membranas de transwell vimos que a inibição é independente do contato e, sendo assim, isso nos levou a questionar se estes fatores solúveis não seriam secretados constitutivamente pelas CTM. Para isso, substituímos as CTM pelo seu sobrenadante condicionado por 48 horas. Nossos resultados mostraram que neste caso não ocorria inibição, sugerindo que para as CTM agirem de forma supressiva as mesmas precisam receber algum sinal das células mononucleares. Observação esta que já tinha sido relatada por Groh e cols. em 2005 (Figura 24).



**Figura 24 – As CTM precisam receber algum sinal para agirem de forma supressiva**

Para que ocorra imunossupressão as CTM precisam receber algum sinal das células mononucleares. Esta sinalização é independente do contato e diversas moléculas têm sido propostas.

#### 6.4 Mecanismos de ação das CTM - Interação CTM Monócito

Os monócitos são células mononucleares circulantes do sangue periférico que, após serem expostas a diferentes microambientes, diferenciam-se em células dendríticas ou macrófagos (Gordon e Taylor, 2005).

De forma inesperada, nossos resultados mostraram que quando as CML eram realizadas na presença de CTM os monócitos aparentemente alteravam sua morfologia, ficando mais homogêneos e com granulidade e tamanho menores. Além disso, estes monócitos aumentavam sua frequência após 6 dias de cultura. Isso nos levou a questionar se as CTM não estariam estimulando sua proliferação mas nossos resultados mostraram que não, sugerindo então que a presença das

CTM estariam aumentando a viabilidade destes monócitos. Na busca por uma possível explicação para o envolvimento dos monócitos neste processo, nos deparamos com informações bastante interessantes e com um valor inestimável para o nosso trabalho.

Está descrito na literatura que existem pelo menos dois tipos de monócitos bem caracterizados, os monócitos que expressam CD14 e CD16 ( $CD14^+CD16^+$ ) e os monócitos que expressam CD14 mas não CD16 ( $CD14^+CD16^-$ ). Estes monócitos diferem em função e em humanos suas freqüências são em torno 10% de  $CD14^+CD16^+$  e 80% de  $CD14^+CD16^-$ . O monócito  $CD14^+CD16^-$  é muito eficiente em inibir células T, não funciona muito bem como APC e não está muito envolvido em reação alogeneicas como CML. Em contrapartida, o monócito  $CD14^+CD16^+$  não inibe células T e funciona muito bem como APC e em CML. Além disso, os monócitos  $CD14^+CD16^-$  produzem altas quantidades de PGE2, IL-1 e IL-6, todos já relatados como envolvidos no processo de imunossupressão mediado pelas CTM (Grage-Griebenow e cols., 2001; Gordon e Taylor, 2005; Tacke e Randolph, 2006; Strauss-Ayali e cols., 2007) (Tabela 2). Tendo em mente estes estudos publicados na literatura e de posse das nossas observações sobre a alteração dos monócitos em CML expostas a ação das CTM, nós levantamos a hipótese de que as CTM estariam interferindo na freqüência destes monócitos, desviando-os para o fenótipo  $CD14^+CD16^-$  (Figura 25). Nossos resultados mostraram que no D0, como descrito na literatura, os monócitos não expressam CD16. No entanto, 3 dias de cultura já são suficientes para que todos os monócitos passem a expressar CD16. A adição de CTM resultou em monócitos com uma menor expressão de CD16 na membrana, sugerindo que as CTM impedem que os monócitos adquiram CD16. Esta redução na expressão do CD16 foi mediada por fatores solúveis uma vez que os experimentos

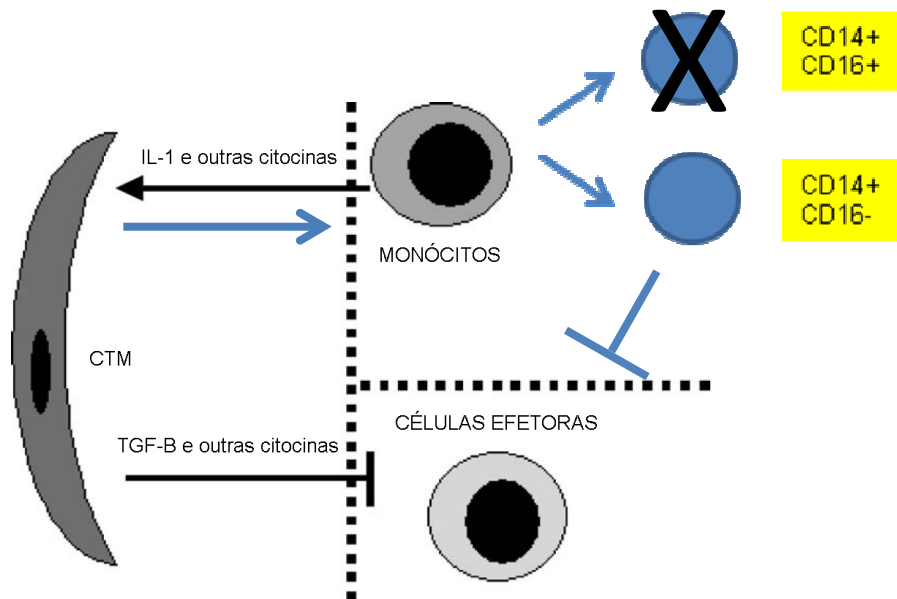
foram feitos utilizando-se membranas de transwell. Estes resultados corroboram nossa hipótese inicial e mostram de forma inédita que as CTM interagem com os monócitos alterando sua morfologia, aumentando sua viabilidade, diminuindo a expressão do CD16 e possivelmente, mantendo-o num estágio supressor.

	Monócito CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	Monócito CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>
PGE <sub>2</sub>	+++	-
IL-1/IL-6	+++	+
APC	+	+++
Inibição de células T	+++	-
CML	±	+++

Adaptado de Grage-Griebenow e cols., 2001 e Gordon e Taylor, 2005

**Tabela 2 – Algumas características que diferem os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> dos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>**

Os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e os CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> diferem em função. Os CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> são eficientes em inibir células T, não funcionam muito bem como APC e não reagem bem em CML. Os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> têm características opostas além de não secretarem PGE2 e secretarem baixas concentrações de IL-1 e IL-6.



Adaptado de Groh e cols., 2005

**Figura 25 – Hipótese de imunossupressão proposta pelo nosso grupo**

As CTM, via secreção de fatores solúveis, impedem a aquisição do CD16 pelos monócitos, possivelmente mantendo-o num estágio supressor. Este monócito secreta altas quantidades de PGE2 e IL-1, inibe células T, não funciona muito bem com APC e não reage bem em CML.

### 6.5 Fenótipo de ativação linfocitária

A resposta imunológica é “orquestrada” pelos linfócitos T auxiliares que, após estimulação antigénica, deixam de ser linfócitos T virgens, proliferam e se diferenciam em subtipos efetores caracterizados pela produção de citocinas específicas e funções efetoras distintas. Mosmann e Coffman propuseram 20 anos atrás que os linfócitos T auxiliares poderiam ser divididos em dois subtipos: Th1 e Th2 (Mosmann e Coffman, 1989). As células Th1 produzem altas quantidades de IFN- $\gamma$  e são altamente eficientes em respostas a patógenos intracelulares mediada pelos linfócitos T citotóxicos. Já as células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25 e são essenciais para as respostas dependentes dos linfócitos B. Mais recentemente outro subtipo de linfócito T auxiliar foi proposto, o subtipo Th17 (Korn

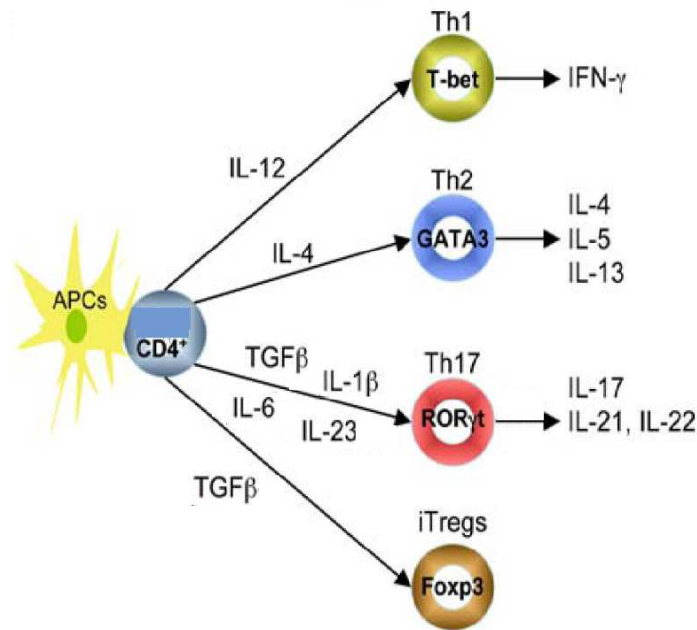
e cols., 2007). Este subtipo estimula respostas inflamatórias e parece ser importante para a defesa das mucosas, além de estar envolvido na patogenia de doenças auto-imunes como um agente causal. Este subtipo linfocitário é caracterizado pela produção de IL-17, IL-21, IL-22 entre outras e seu fenótipo é estimulado pelas citocinas TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 (Figura 26). As células T regulatórias também podem ser diferenciadas a partir de células T CD4<sup>+</sup> virgens quando expostas ao TGF- $\beta$  e desta forma, o TGF- $\beta$  pode atuar tanto estimulando uma resposta inflamatória, via Th17, quanto estimulando uma resposta supressora via iTreg. Os mecanismos que governam esta diferenciação ainda não estão claros mas parece que as concentrações do TGF- $\beta$  são cruciais. Baixas concentrações estimulam Th17 e altas concentrações parecem estimular as iTreg (Ivanov e cols., 2007), (Figura 27).

Existem dois trabalhos mostrando que as CTM desviam a resposta Th1 para a resposta Th2 (Aggarwal e cols., 2005; Batten e cols., 2006) e alguns trabalhos mostrando que as CTM induzem iTreg (Vide 1.2.2.1).

Nosso interesse em estudar o perfil de ativação linfocitária partiu de diversas evidências mostrando que as citocinas TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Groh e cols., 2005; Djouad e cols., 2007) estão envolvidas na imunossupressão mediada pelas CTM e também de estudos mostrando que monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> “supressores” produzem IL-1 $\beta$  e IL-6 (Grage-Griebenow e cols., 2001; Gordon e Taylor, 2005; Tacke e Randolph, 2006; Strauss-Ayali e cols., 2007). Estes estudos nos levaram a perguntar se as CTM não estariam desviando o fenótipo de ativação linfocitária para um perfil inflamatório Th17, o que de certa forma seria uma contradição já que as CTM são ditas serem imunossupressoras. Além disso, como as células iTreg também são diferenciadas a partir do TGF- $\beta$ , nós nos perguntamos se estas células também não estariam sendo geradas. Desta forma, nossa hipótese é que as CTM desviariam



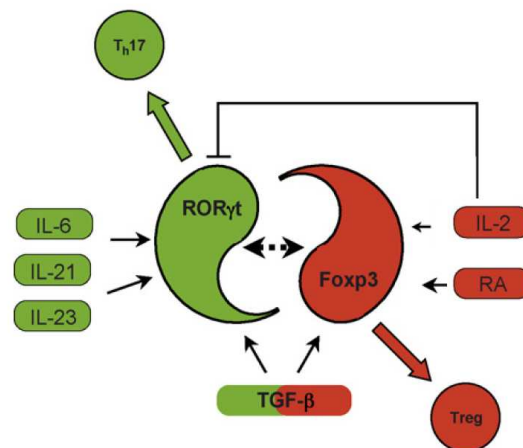
simultaneamente a resposta para os fenótipos Th17 e iTreg e que, para que ocorresse imunossupressão, o fenótipo iTreg seria prevalente sobre o fenótipo Th17. Para avaliar a ativação linfocitária empregamos a técnica de PCR em Tempo-Real e utilizamos primers para os fatores de transcrição característicos de cada subtipo: T-bet para Th1, GATA3 para Th2, ROR $\gamma$ t para Th17 e Foxp3 para iTreg. Nossos resultados mostraram que tanto os níveis de mRNA de ROR $\gamma$ t quanto os níveis de mRNA de Foxp3 estavam aumentados na presença de CTM no D3, embora o desvio padrão estivesse grande (Vide 5.9). No D6, embora sem diferenças significativas, os níveis de mRNA de Foxp3 mantiveram-se aumentados e os níveis de mRNA de ROR $\gamma$ t diminuíram em relação à CML sem CTM. Ainda que estes resultados pareçam corroborar com nossa hipótese experimentos adicionais precisam ser feitos. Estes experimentos incluem a análise das citocinas das culturas com e sem CTM e a análise dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t e Foxp3 nas células T auxiliares. Cabe lembrar que avaliamos os níveis de mRNA nas células mononucleares totais e isso pode nos levar a erros, uma vez que outras subpopulações podem expressar estes fatores de transcrição.



Adaptado de Takatori e cols., 2008

**Figura 26 – Fenótipo de ativação dos linfócitos T auxiliares**

Os linfócitos T auxiliares virgens (CD4<sup>+</sup>), após estimulação antigênica, podem diferenciar-se em subtipos distintos como Th1, Th2, Th17 e iTreg. Atualmente, o fenótipo Th9 também tem sido proposto. Esta diferenciação depende do microambiente em que estes linfócitos estão expostos. Note que o TGB-  $\beta$  contribui para a diferenciação de Th17 e iTreg.



Adaptado de Ivanov e cols. 2007

**Figura 27 – Os fenótipos de ativação Th17 (ROR $\gamma$ t) e iTreg (Foxp3) são regulados pelo TGB-  $\beta$**

Em verde está representado o programa de diferenciação de Th17 e em vermelho o programa de diferenciação de iTreg. IL-2, ácido aracdônico (RA) e TGF-  $\beta$  induzem iTreg. O mesmo TGF-  $\beta$  pode, no entanto, induzir Th17 quando na presença de IL-6, -21 e -23 e IL-1 $\beta$ .

## 7. CONCLUSÕES

- O presente estudo demonstrou que as CTM são capazes de inibir a proliferação de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, linfócitos B e células NK.
- Esta inibição é mediada por fatores solúveis, que não são constitutivamente secretados pelas CTM.
- As CTM precisam receber algum sinal das células mononucleares para agirem de forma supressiva sobre as mesmas.
- Monócitos de CML na presença de CTM têm sua morfologia aparentemente alterada. Além disso, a concentração de monócitos encontra-se aumentada na presença de CTM.
- O aumento na concentração de monócitos não se deve a mecanismos de proliferação, o que sugere que as CTM aumentam a viabilidade destes monócitos.
- Os monócitos de sangue periférico não expressam CD16. No entanto, 3 dias de cultura são suficientes para fazer com que os monócitos adquiram a expressão do CD16.
- Esta aquisição do CD16 é inibida pela presença das CTM, sugerindo que as CTM mantêm os monócitos com um fenótipo imunossupressor.
- As CTM parecem induzir um aumento nos níveis de mRNA de ROR $\gamma$ t e Foxp3, sugerindo um desvio da ativação linfocitária para os fenótipos Th17 e iTreg.
- Os níveis de mRNA de Foxp3 foram 2,5x maiores que os níveis de mRNA de ROR $\gamma$ t (7.36 e 2.94, respectivamente) sugerindo que o fenótipo supressor iTreg prevalece sobre o fenótipo inflamatório Th17, gerando conseqüentemente um resultado imunossupressor. Estes dados não são definitivos e ainda precisam ser confirmados por análises mais refinadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL S, PITTENGER MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-22.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia molecular da célula* 4ª Edição.
- ANGOULVANT D, CLERC A, BENCHALAL S, GALAMBRUN C, FARRE A, BERTRAND Y, ELJAAFARI A. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology*. 2004;41:469-76.
- ANSEL KM, LEE DU, RAO A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat.Immunol*. 2003;4:616–23.
- APPELBAUM FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med*. 2003;491-512.
- ASANO M, TODA M, SAKAGUCHI N, SAKAGUCHI S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996;184:387-96.
- BACIGALUPO A, VALLE M, PODESTÀ M, PITTO A, ZOCCHI E, DE FLORA A, POZZI S, LUCHETTI S, FRASSONI F, VAN LINT MT, PIAGGIO G. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2005;33:819-27.
- BACIGALUPO A. Management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007 ;137:87-98.
- BALL LM, BERNARDO ME, ROELOFS H, LANKESTER A, COMETA A, EGELER RM, LOCATELLI F, FIBBE WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110:2764-7.
- BALL L, BREDIUS R, LANKESTER A, SCHWEIZER J, VAN DEN HEUVEL-EIBRINK M, ESCHER H, FIBBE W, EGELER M. Third party mesenchymal stromal cell infusions fail to induce tissue repair despite successful control of severe grade IV acute graft-versus-host disease in a child with juvenile myelo-monocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;22:1256-7.
- BARDA-SAAD M, ROZENSZAJN LA, GLOBERSON A, ZHANG AS, ZIPORI D. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis. *Exp Hematol*. 1996;24:386-91.
- BARTHOLOMEW A, STURGEON C, SIATSKAS M, FERRER K, MCINTOSH K, PATIL S, HARDY W, DEVINE S, UCKER D, DEANS R, MOSELEY A, HOFFMAN R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30:42-8.
- BATTEN P, SARATHCHANDRA P, ANTONIOW JW, TAY SS, LOWDELL MW, TAYLOR PM, YACOUB MH. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy

and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng.* 2006;12:2263-73.

BENSIDHOUM M, CHAPEL A, FRANCOIS S, DEMARQUAY C, MAZURIER C, FOUILLARD L, BOUCHET S, BERTHO JM, GOURMELON P, AIGUEPERSE J, CHARBORD P, GORIN NC, THIERRY D, LOPEZ M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood.* 2004;103:3313-9.

BEYTH S, BOROVSKY Z, MEVORACH D, LIEBERGALL M, GAZIT Z, ASLAN H, GALUN E, RACHMILEWITZ J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105:2214-9.

BIANCO P, KUZNETSOV SA, RIMINUCCI M, GEHRON ROBEY P. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:117-48.

CHAN JL, TANG KC, PATEL AP, BONILLA LM, PIEROBON N, PONZIO NM, RAMESHWAR P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood.* 2006;107:4817-24.

CHEN J, LI Y, WANG L, ZHANG Z, LU D, LU M, CHOPP M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2001;32:1005-11.

CHENG L, QASBA P, VANGURI P, THIEDE MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2000;184:58-69.

COMOLI P, GINEVRI F, MACCARIO R, AVANZINI MA, MARCONI M, GROFF A, COMETA A, CIONI M, PORRETTI L, BARBERI W, FRASSONI F, LOCATELLI F. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:1196-202.

CORCIONE A, BENVENUTO F, FERRETTI E, GIUNTI D, CAPPIELLO V, CAZZANTI F, RISSO M, GUALANDI F, MANCARDI GL, PISTOIA V, UCCELLI A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107:367-72.

DA SILVA MEIRELLES L, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.

DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-84.

DI NICOLA M, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD, MATTEUCCI P, GRISANTI S, GIANNI AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838-43.

DJOUAD F, CHARBONNIER LM, BOUFFI C, LOUIS-PLENCE P, BONY C, APPARAILLY F, CANTOS C, JORGENSEN C, NOËL D. Mesenchymal stem cells

inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cell* 2007;25:2025-32.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.

ELIOPOULOS N, STAGG J, LEJEUNE L, POMMEY S, GALIPEAU J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. 2005;106:4057-65.

FANG B, SONG Y, LIN Q, ZHANG Y, CAO Y, ZHAO RC, MA Y. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. *Pediatr Transplant*. 2007;11:814-7.

FANG L, LANGE C, ENGEL M, ZANDER AR, FEHSE B. Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. *Transplantation*. 2006;82:1370-3.

FRIEDENSTEIN AJ, PIATETZKY-SHAPIRO II, PETRAKOVA KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16:381-90.

FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AI, FROLOVA GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230-47.

GIORDANO A, GALDERISI U, MARINO IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007;211:27-35.

GLENNIE S, SOEIRO I, DYSON PJ, LAM EW, DAZZI F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105:2821-7.

GNECCHI M, HE H, LIANG OD, MELO LG, MORELLO F, MU H, NOISEUX N, ZHANG L, PRATT RE, INGWALL JS, DZAU VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005;11:367-8.

GORDON S, TAYLOR PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953-64.

GRAGE-GRIEBENOW E, FLAD HD, ERNST M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001;69:11-20.

GROH ME, MAITRA B, SZEKELY E, KOÇ ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*. 2005;33:928-34.

HORWITZ EM. Mesenchymal Cells Information Summary. *Mesenchymal Cells: A Basic Review* 2002a.

HORWITZ EM, GORDON PL, KOO WK, MARX JC, NEEL MD, MCNALL RY, MUUL L, HOFMANN T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002b;99:8932-7.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A; The International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7:393-5.

IVANOV II, ZHOU L, LITTMAN DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 2007; 19: 409-17.

JAKSCH M, MATTSSON J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol*. 2005;61:398-409.

JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M. *Immunobiology* 6<sup>a</sup> Edição.

JAVAZON EH, BEGGS KJ, FLAKE AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32:414-25.

JIANG XX, ZHANG Y, LIU B, ZHANG SX, WU Y, YU XD, MAO N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105:4120-6.

KIERNEY PC, DORSHKIND K. B lymphocyte precursors and myeloid progenitors survive in diffusion chamber cultures but B cell differentiation requires close association with stromal cells. *Blood*. 1987;70:1418-24.

KINNAIRD T, STABILE E, BURNETT MS, SHOU M, LEE CW, BARR S, FUCHS S, EPSTEIN SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109:1543-9.

KOÇ ON, GERSON SL, COOPER BW, DYHOUSE SM, HAYNESWORTH SE, CAPLAN AI, LAZARUS HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000;18:307-16.

KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10711-6.

KORN T, OUKKA M, KUCHROO V, BETTELLI E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007; 19: 362-71.

KRAMPERA M, COSMI L, ANGELI R, PASINI A, LIOTTA F, ANDREINI A, SANTARLASCIO V, MAZZINGHI B, PIZZOLO G, VINANTE F, ROMAGNANI P, MAGGI E, ROMAGNANI S, ANNUNZIATO F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386-98.

KUCEROVA L, ALTANEROVA V, MATUSKOVA M, TYCIAKOVA S, ALTANER C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2007;67:6304-13.

KUMAR L. Haematopoietic stem cell transplantation: current status. *Natl Med J India.* 2007;20:128-37.

LAZARUS HM, KOC ON, DEVINE SM, CURTIN P, MAZIARZ RT, HOLLAND HK, SHPALL EJ, MCCARTHY P, ATKINSON K, COOPER BW, GERSON SL, LAUGHLIN MJ, LOBERIZA FR JR, MOSELEY AB, BACIGALUPO A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:389-98.

LE BLANC K, TAMMIK C, ROSENDAHL K, ZETTERBERG E, RINGDÉN O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003a;31:890-6.

LE BLANC K, TAMMIK L, SUNDBERG B, HAYNESWORTH SE, RINGDÉN O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003b;57:11-20.

LE BLANC K, RASMUSSEN I, GÖTHERSTRÖM C, SEIDEL C, SUNDBERG B, SUNDIN M, ROSENDAHL K, TAMMIK C, RINGDÉN O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004a;60:307-15.

LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, GÖTHERSTRÖM C, HASSAN M, UZUNEL M, RINGDÉN O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004b;363:1439-41.

LE BLANC K, SAMUELSSON H, GUSTAFSSON B, REMBERGER M, SUNDBERG B, ARVIDSON J, LJUNGMAN P, LÖNNIES H, NAVA S, RINGDÉN O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2007;21:1733-8.

LECHLER R, BATCHELOR R, LOMBARDI G. The relationship between MHC restricted and allospecific T cell recognition. *Immunol Lett.* 1991;29:41-50.

LI GR, DENG XL, SUN H, CHUNG SS, TSE HF, LAU CP. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells.* 2006;24:1519-28.

MACCARIO R, PODESTÀ M, MORETTA A, COMETA A, COMOLI P, MONTAGNA D, DAUDT L, IBATICI A, PIAGGIO G, POZZI S, FRASSONI F, LOCATELLI F. 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.* 2005;90:516-25.

MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, KONISHI F, KODAMA H, PAN J, SANO M, TAKAHASHI T, HORI S, ABE H, HATA J, UMEZAWA A, OGAWA S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.



MANSILLA E, MARÍN GH, DRAGO H, STURLA F, SALAS E, GARDINER C, BOSSI S, LAMONEGA R, GUZMÁN A, NUÑEZ A, GIL MA, PICCINELLI G, IBAR R, SORATTI C. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc.* 2006;38:967-9.

MEISEL R, ZIBERT A, LARYEA M, GÖBEL U, DÄUBENER W, DILLOO D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004;103:4619-21.

MEHRA NK, KAUR G. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Med.* 2003;5:1-17.

MOSMANN TR, COFFMAN RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-73.

NASEF A, MATHIEU N, CHAPEL A, FRICK J, FRANÇOIS S, MAZURIER C, BOUTARFA A, BOUCHET S, GORIN NC, THIERRY D, FOUILLARD L. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation.* 2007;84:231-7.

NASEF A, MAZURIER C, BOUCHET S, FRANÇOIS S, CHAPEL A, THIERRY D, GORIN NC, FOUILLARD L. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol.* 2008;253:16-22.

NAUTA AJ, WESTERHUIS G, KRUISSELBRINK AB, LURVINK EG, WILLEMZE R, FIBBE WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006a;108:2114-20.

NAUTA AJ, KRUISSELBRINK AB, LURVINK E, WILLEMZE R, FIBBE WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2006b;177:2080-7.

NAUTA AJ, FIBBE WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499-506.

NING H, YANG F, JIANG M, HU L, FENG K, ZHANG J, YU Z, LI B, XU C, LI Y, WANG J, HU J, LOU X, CHEN H. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia.* 2008;22:593-9.

ORTIZ LA, GAMBELLI F, MCBRIDE C, GAUPP D, BADDIO M, KAMINSKI N, PHINNEY DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8407-11.

OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42-60.

PEDEMONTE E, BENVENUTO F, CASAZZA S, MANCARDI G, OKSENBERG JR, UCCELLI A, BARANZINI SE. The molecular signature of therapeutic mesenchymal stem cells exposes the architecture of the hematopoietic stem cell niche synapse. *BMC Genomics*. 2007;8:65.

PETERSDORF EW, GOOLEY TA, ANASETTI C, MARTIN PJ, SMITH AG, MICKELSON EM, WOOLFREY AE, HANSEN JA. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 1998;92:3515-20.

PIJNAPPELS DA, SCHALIJ MJ, VAN TUYN J, YPEY DL, DE VRIES AA, VAN DER WALL EE, VAN DER LAARSE A, AT SMA DE. Progressive increase in conduction velocity across human mesenchymal stem cells is mediated by enhanced electrical coupling. *Cardiovasc Res*. 2006;72:282-91.

PITTINGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7

PLUMAS J, CHAPEROT L, RICHARD MJ, MOLENS JP, BENZA JC, FAVROT MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*. 2005;19:1597-604.

POGGI A, PREVOSTO C, ZANCOLLI M, CANEVALI P, MUSSO A, ZOCCHI MR. NKG2D and natural cytotoxicity receptors are involved in natural killer cell interaction with self-antigen presenting cells and stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1109:47-57.

POLCHERT D, SOBINSKY J, DOUGLAS G, KIDD M, MOADSIRI A, REINA E, GENRICH K, MEHROTRA S, SETTY S, SMITH B, BARTHOLOMEW A. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38:1745-55.

POTIAN JA, AVIV H, PONZIO NM, HARRISON JS, RAMESHWAR P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*. 2003;171:3426-34.

PREVOSTO C, ZANCOLLI M, CANEVALI P, ZOCCHI MR, POGGI A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007;92:881-8.

RAMASAMY R, FAZEKASOVA H, LAM EW, SOEIRO I, LOMBARDI G, DAZZI F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007;83:71-6.

RAMASAMY R, TONG CK, SEOW HF, VIDYADARAN S, DAZZI F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol*. 2008;251:131-6.

RASMUSSEN I, RINGDÉN O, SUNDBERG B, LE BLANC K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76: 1208-13.

RASMUSSEN I, RINGDÉN O, SUNDBERG B, LE BLANC K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res.* 2005;305:33-41.

RASMUSSEN I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2006;312:2169-79.

RASMUSSEN I, LE BLANC K, SUNDBERG B, RINGDÉN O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:336-43.

RIDDELL SR, APPELBAUM FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med.* 2007;4: 1174-7.

RINGDÉN O, UZUNEL M, RASMUSSEN I, REMBERGER M, SUNDBERG B, LÖNNIES H, MARSCHALL HU, DLUGOSZ A, SZAKOS A, HASSAN Z, OMAZIC B, ASCHAN J, BARKHOLT L, LE BLANC K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006;81:1390-7.

SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSSEN W, PATEL N, COOPER DR, SANBERG PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000;164:247-56.

SATO K, OZAKI K, OH I, MEGURO A, HATANAKA K, NAGAI T, MUROI K, OZAWA K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007;109:228-34.

SELMANI Z, NAJI A, ZIDI I, FAVIER B, GAIFFE E, OBERT L, BORG C, SAAS P, TIBERGHEN P, ROUAS-FREISS N, CAROSELLA ED, DESCHASEAUX F. 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.* 2008;26:212-22.

SESHI B, KUMAR S, SELLERS D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26:234-46.

SESHI B, KUMAR S, KING D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;31:268-85.

SHLOMCHIK WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:340-52.

SOTIROPOULOU PA, PEREZ SA, GRITZAPIS AD, BAXEVANIS CN, PAPANICHAEL M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 2006;24:74-85.

SPAGGIARI GM, CAPOBIANCO A, BECCHETTI S, MINGARI MC, MORETTA L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107:1484-90.

SPEES JL, OLSON SD, YLOSTALO J, LYNCH PJ, SMITH J, PERRY A, PEISTER A, WANG MY, PROCKOP DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2397-402.

SPEES JL, OLSON SD, WHITNEY MJ, PROCKOP DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1283-8.

STAGG J, POMMEY S, ELIOPOULOS N, GALIPEAU J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006;107:2570-7.

STRAUSS-AYALI D, CONRAD SM, MOSSER DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82:244-52.

TABERA S, PÉREZ-SIMÓN JA, DÍEZ-CAMPELO M, SÁNCHEZ-ABARCA LI, BLANCO B, LÓPEZ A, BENITO A, OCIO E, SÁNCHEZ-GUIJO FM, CAÑIZO C, SAN MIGUEL JF. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008;93:1301-9.

TACKE F, RANDOLPH GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):609-18.

TAKATORI H, KANNO Y, CHEN Z, O'SHEA JJ. New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases. *Mod Rheumatol*. 2008;18:533-41.

TÖGEL F, HU Z, WEISS K, ISAAC J, LANGE C, WESTENFELDER C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:F31-42.

TSE WT, PENDLETON JD, BEYER WM, EGALKA MC, GUINAN EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75:389-97.

VELDHOEN M, UYTENHOVE C, VAN SNICK J, HELMBY H, WESTENDORF A, BUER J, MARTIN B, WILHELM C, STOCKINGER B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9:1341-6.

WAGNER JE, THOMPSON JS, CARTER SL, KERNAN NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* 2005; 366: 733-41.

WAKITANI S, SAITO T, CAPLAN AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18:1417-26.

WANG Y, JOHNSEN HE, MORTENSEN S, BINDSLEV L, RIPA RS, HAACK-SØRENSEN M, JØRGENSEN E, FANG W, KASTRUP J. Changes in circulating

mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*. 2006;92:768-74.

WANKO SO, CHAO NJ. Non-pharmacologic approaches to graft-versus-host prevention. *Blood Rev*. 2005;19:203-11.

YU S, TANABE T, DEZAWA M, ISHIKAWA H, YOSHIMURA N. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344:1071-9.

ZAPPIA E, CASAZZA S, PEDEMONTE E, BENVENUTO F, BONANNI I, GERDONI E, GIUNTI D, CERAVOLO A, CAZZANTI F, FRASSONI F, MANCARDI G, UCCELLI A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106:1755-61.

ZHANG W, GE W, LI C, YOU S, LIAO L, HAN Q, DENG W, ZHAO RC. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13:263-71.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)