

RAFAEL ASSUMPÇÃO LAROCCA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A  
ALOANTÍGENOS POR CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

RAFAEL ASSUMPÇÃO LAROCCA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A ALOANTÍGENOS  
POR CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO TECIDO  
ADIPOSO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Niels Olsen Saraiva Camara

São Paulo  
2009

Dedico este trabalho a minha mãe Mara e ao meu pai Rafael, pois vocês me deram o que mais importa na formação de uma pessoa, AMOR e o direito a EDUCAÇÃO. Amo vocês e sempre serei grato por tudo.

A minha avó Maria pelos conselhos e carinho. Meu tio Jorge pelas conversas de sabedoria e carinho. A minha tia Sueli que sempre fez o que pode para me ajudar. Ao meu irmão Alexandre o qual tenho um amor incondicional. A minha esposa Érica que nos momentos de fúria, tristeza e alegria sempre esteve ao meu lado.

Aos anjos da guarda: primeiramente meu avo João, uma pessoa correta em quem me espelhei a vida toda, e ao meu amigo Amarildo, que me ajudou em todos os momentos da realização deste trabalho, fiquem com Deus.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Amigo, Padrinho e Orientador Niels Olsen, por ter me dado o privilégio de trabalhar ao seu lado. Nesses três anos de convivência sei que hoje sou uma pessoa mais madura e devo muito disso a você. Sou cabeça dura, mas como o próprio ditado diz “água mole em pedra dura tanto bate até que fura”. Obrigado.

Aos amigos/colegas de laboratório de Imunobiologia de Transplantes do ICB, Alex, André, Angela, Bruno, Cintia, Claudinha, Enio, Gabi, Giancarlo, Gisele, Leandro, Mariane, Matheus, Mayra, Patricia, Pedro, Rebeca, Reinaldo, Richardt, Rosa, Tércio, Vanessa.

Aos professores Barbutto, Irina e Marcelo de Franco pelos conselhos durante o exame de qualificação que ajudaram na realização deste trabalho.

Aos velhos amigos de todos esses anos Jean Pierre, Luisão, José Antônio, Lucas Faustino, Matheus Ferraccini, Paulo, Josias, Paolo, Daniel.

Aos amigos Pedro, Ênio, Rosa e Patricia pelo apoio na realização dos experimento e pela amizade.

A todos meus amigos do Departamento de Imunologia pelos momentos compartilhados.

Ao professor Momtchilo por sempre manter as portas de seu laboratório abertas;

Ao professor Gustavo pelo apoio durante o PAE, pela carta de recomendação e pela amizade.

Ao professor Álvaro Pacheco por ter me apresentado ao professor Terry Strom.

Às meninas da secretaria Eni, Amanda e Jotelma.

Aos meus grandes amigos Milton e Otacilio da portaria.

Aos camundongos, que já ajudaram a salvar inúmeras vidas.

À Fapesp e ao Cnpq pelo apoio financeiro.

Obrigado a todos

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

Por que é tão difícil encontrar uma frase que se encaixe aqui? Deve ser porque é difícil resumir o trabalho de anos em uma frase!

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma  
µl: microlitro  
AC: anticorpo  
ADP: adenosina difosfato  
ADSC: célula-tronco derivada de tecido adiposo  
AIRE: molécula reguladora de autoimunidade  
APC: célula apresentadora de antígeno  
ATP: adenosina trifosfato  
cAMP: AMP cíclico  
CD: molécula CD (Clusters Differentiation)  
cDNA: DNA complementar  
CT: célula-tronco  
CTA: célula-tronco adulta  
CTE: célula-tronco embrionária  
CTH: célula-tronco hematopoiética  
CTLA-4: antígeno de linfócito T citotóxico 4  
CTM: célula-tronco mesenquimal  
DMEM: meio de cultura  
SCID: imunodeficiência severa combinada  
SFB: soro fetal bovino  
STAT: fator transdutor de sinal e ativador transcrição  
Tbet: fator de transcrição *tbet*  
TCR: receptor de células T  
TGF-β: fator transformador de crescimento - β  
Th: célula T auxiliar  
TLR: receptor do tipo Toll  
Treg: células T reguladoras  
Tx: transplante

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato  
EAE: encefalomielite autoimune experimental  
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético  
FACS: citometria de fluxo  
FMMO: fração mononuclear de medula óssea  
Foxp3: fator de transcrição *foxp3*  
g: grama  
GATA3: fator de transcrição *gata-3*  
GITR: glicocorticóide  
IDO: indoleamina 2,3 - deoxigenase



IFN- $\gamma$ : interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: interleucina

IR: índice de expressão relativa

Kb: kilobase

l: litro

M: molar

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

mL: mililitro

mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico

ng: nanograma

NK: células matadoras naturais

NKT: célula T matadora natural

°C: grau Celsius

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato de sódio

RNase: Ribonuclease

ROR $\gamma$ T: receptor órfão  $\gamma$

Rpm: rotações por minuto

## RESUMO

Larocca RA. Modulação da Resposta Imune a aloantígenos por Células-Tronco derivadas do tecido adiposo [Tese, Doutorado em Imunologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O sucesso dos transplantes de órgãos sólidos depende fundamentalmente do controle da resposta imune aos aloantígenos. Mesmo assim, a sobrevida de um enxerto não é definitiva. Portanto, a indução de tolerância imunológica em transplantes representa um ideal a ser alcançado. A identificação e caracterização de uma população de células reguladoras (Treg), as quais são capazes de controlar a resposta imune a aloantígenos, trouxeram uma nova perspectiva para a indução da tolerância imunológica em transplante. Essas células são geradas naturalmente no timo, em uma baixa frequência e são identificadas principalmente pela expressão de marcadores como as moléculas CD25 e Foxp3. As Treg também podem ser expandidas ou até mesmo originadas na periferia, quando estimuladas pela presença de citocinas ou de populações especiais de células. Com base nestas informações, nós utilizamos células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC), as quais possuem a capacidade de suprimir uma resposta imune no nosso modelo experimental. Assim, nossa proposta foi avaliar se as ADSC poderiam melhorar a sobrevida de um enxerto da cauda do doador alogênico CBA/J em camundongos C57BL/6 e se esta melhora estaria associada à indução de Treg na periferia. Após 24 h os animais transplantados receberam ADSC do doador alogênico CBA/J  $2 \times 10^5$  via intraperitoneal. Nos dias 3, 10 e no dia da rejeição os linfonodos drenantes e o enxerto foram removidos para análise do padrão de citocinas presentes e também a participação das Treg na resposta imune. Nós observamos que o tratamento com as ADSC levou a um aumento média da sobrevida do enxerto de 16,5 dias ( $p = 0,002$ ), com uma melhora visível na morfologia do enxerto. Nos linfonodos dos animais tratados com as ADSC observamos um aumento na população de linfócitos T  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  nas primeiras 72 horas, com um aumento na expressão de  $IFN-\gamma$  e IL-10, no dia 10 após o transplante. A análise do enxerto nas primeiras 72 horas mostrou uma inibição da expressão de IL-17 nos animais tratados com as ADSC, acompanhada de uma inibição na proliferação de células T  $CD4^+$ , correlacionada com a baixa produção local de  $IFN-\gamma$  e IL-17. Nossos achados sugerem que as ADSC suprimem a resposta imune ao enxerto, por meio da indução de Treg nas primeiras horas e inibe a participação das células Th17 neste processo, levando a uma melhora no enxerto. Estes dados ajudam a desenvolver novos aspectos na estratégia terapêutica e possivelmente o uso futuro dessas células na prática clínica.

Palavras-chave: Transplante de pele. Tolerância Imunológica. Células-tronco Mesenquimais.

## SUMMARY

Larocca RA. Modulation of Immune alloresponse by Adipose-tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. [Thesis, PhD Immunology Program]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The success of solid organ transplantation is mainly due to control alloantigen immune response. Although, the current allogeneic graft survival is not definitive. Therefore, the induction of allograft tolerance is considered the Holy Grail in transplantation immunobiology. The identification and characterization of regulatory T cells (Treg) that can control immune responsiveness to alloantigens have opened up exciting opportunities for new therapies in Transplantation. These cells are naturally generated in the thymus and are at low frequency in normal conditions, being identified by the surface molecule markers such as CD25 and Foxp3. Treg cells can also be expanded and generated in the periphery, when stimulated with specific cytokines or special cell population. In this work, we believe that is possible to induce these cells in the periphery by stimulation with adipose-tissue derived mesenchymal stem cells, which have the capacity of suppressing the immune response. Then, we propose to study the role of ADSC cells in prolonging skin allograft survival, and whether this is associated with Treg cells induction in the periphery. C57Bl/6 mice were grafted with the skin tail from allogeneic donors (CBA/J). ADSC were isolated from CBA/J abdominal fat tissue and injected in recipients at 24 hours after engraftment. At 3 and 10 days after engraftment and at rejection time, the draining lymph-nodes and graft itself were studied. The cells from the draining lymph-nodes were analyzed by flow cytometry and IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 and Foxp3 mRNA were quantified in draining lymph-nodes and in the graft. Graft survival was enhanced in animals that received ADSC from the skin donor (16,5; P = 0,002). Interestingly, ADSC-treated animals presented a higher expression of Foxp3<sup>+</sup> cells in the CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell population in the lymph-nodes at 72 hr with an enhancement in IFN-g and IL-10 mRNA expression after surgery. In ADSC-treated mice we also noticed a low expression of IL-17 /in vivo /at 72 hs. Moreover, /in vitro/ analyses showed a capacity of ADSC in inhibiting T CD4<sup>+</sup> cells proliferation, and this suppression was accompanied by decreased levels of IFN- $\gamma$  and Il-17. Our data suggest that ADSC suppress the allogeneic immune response with early induction of Treg population cells and inhibit Th17 cells, prolonging longer skin graft survival. These data open news perspectives for therapeutic use in clinical setting.

keywords: Transplantation. Immunological Tolerance. Mesenchymal Stem Cells.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Histórico</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Imunologia da Rejeição</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Caracterização das sub-populações de linfócitos T</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 Tolerância Imunológica</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Células T reguladoras</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6 Células-tronco</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7 Células-tronco adultas</b> .....	<b>28</b>
<b>1.8 Células-tronco Mesenquimais (CTM)</b> .....	<b>29</b>
<b>1.9 CTM e a inibição da resposta imune</b> .....	<b>30</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 Geral:</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2 Específicos:</b> .....	<b>33</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Animais de experimentação</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 Isolamento, caracterização, diferenciação das células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongos</b> .....	<b>34</b>
<i>Caracterização fenotípica</i> .....	<b>35</b>
<i>Diferenciação adipogênica</i> .....	<b>36</b>
<i>Diferenciação osteogênica</i> .....	<b>36</b>
<i>Diferenciação condrogênica</i> .....	<b>37</b>
<b>3.3 Isolamento da Fração mononuclear de medula óssea</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4 Transplante de Pele</b> .....	<b>38</b>
<b>3.5 Citometria de Fluxo</b> .....	<b>38</b>
<i>Imunofenotipagem de Células T Reguladoras</i> .....	<b>38</b>
<i>Citocina Intracelular</i> .....	<b>39</b>
<b>3.6 PCR em Tempo Real</b> .....	<b>39</b>
<i>Extração de RNA</i> .....	<b>39</b>
<i>Quantificação de RNA</i> .....	<b>40</b>
<i>Tratamento com DNAase</i> .....	<b>40</b>
<i>Transcrição reversa</i> .....	<b>41</b>
<i>Reação de PCR em tempo real</i> .....	<b>41</b>

3.7 Isolamento das células T CD4+ .....	43
3.8 Ensaio de Resposta linfoproliferativa.....	43
3.9 Ensaio de citocinas por Bioplex.....	44
3. 10 Análise Histológica.....	45
3.11 Análise estatística.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Caracterização <i>in vitro</i> das ADSC: potencial de diferenciação.....	46
4.2 Caracterização <i>in vitro</i> das ADSC: fenótipo celular .....	50
4.3 Análise da sobrevida do enxerto de pele após tratamento com diferentes populações celulares .....	53
4.4 Estudo histológico do enxerto após o transplante alogênico nos animais tratados ou não com ADSC.....	56
4.5 Caracterização do perfil de citocinas e de moléculas relacionadas ao fenótipo de células T reguladoras presentes na pele e no linfonodo drenante no dia da rejeição .....	59
4.6 Análise da expressão de citocinas e de moléculas relacionadas a regulação da resposta imune no linfonodo drenante, 3 e 10 dias após o transplante .....	61
4.7 Análise das citocinas relacionadas a diferenciação de células Th17 nos linfonodos drenantes.....	63
4.8 Análise da expressão de citocinas e moléculas relacionadas a regulação da resposta imune no enxerto, 3 e 10 dias após o transplante ..	65
4.9 Análise das citocinas relacionadas a diferenciação de células Th17 no enxerto .....	67
4.10 Identificação das citocinas secretadas pelas células T CD4+ presentes no linfonodo drenante e células T reguladoras por citometria de fluxo ..	69
4.11 Avaliação da resposta linfoproliferativa frente ao estímulo alogênico. ....	72
4.12 Quantificação das citocinas produzidas no ensaio de linfoproliferação.....	74
5 DISCUSSÃO .....	77
6 CONCLUSÕES .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A imunologia dos transplantes teve início na década de 40 quando o biólogo britânico Peter Medawar e seu colega cirurgião plástico Thomas Gibson descreveram a primeira experiência de transplante de pele em humanos no ano de 1943. Durante a segunda guerra mundial, a frequência de casos de queimaduras com extensas áreas lesionadas deu início à busca por doadores de tecidos. Como parte do procedimento, os pesquisadores removeram pequenas partes de tecido da própria paciente para substituir as áreas queimadas (transplante autólogo), e junto a esses enxertos foram adicionados partes da pele de seu irmão (transplante homólogo). Dias depois, ao avaliarem o aspecto dos enxertos, eles observaram que a pele proveniente do transplante autólogo estava aderida e permanecia com um aspecto saudável. Por outro lado, os enxertos provenientes do irmão apresentavam uma degeneração tecidual 15 dias após o transplante, sendo totalmente rejeitados no dia 23. Após um primeiro momento de surpresa com os resultados, os pesquisadores decidiram realizar um segundo transplante com a pele proveniente do irmão e perceberam uma rejeição acelerada (8 dias pós transplante), a qual eles chamaram de imunização ativa [1].

Em seguida, Medawar decidiu por uma abordagem experimental em grande escala em coelhos, que o permitiu acompanhar melhor as mudanças histológicas observadas. As análises dos resultados foram descritos em dois artigos publicados. O primeiro, publicado em 1944, contém uma detalhada descrição da morfologia e histologia do enxerto, onde o autor observa a presença de um intenso infiltrado inflamatório de linfócitos e monócitos [2]. Em seu segundo estudo, Medawar confirmou suas observações anteriores, principalmente com os experimentos de re-transplante, e concluiu que o tempo de sobrevivência do enxerto é determinado pela expressão de

antígenos nos doadores e receptores, postulando as Leis do Transplante e estabelecendo uma íntima relação entre a rejeição de transplantes e o sistema imune [3].

O sistema imune é classicamente dividido em dois compartimentos: o sistema imune inato compreende a participação dos monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e as células matadoras naturais NK (do inglês, *Natural Killer*), além de componentes solúveis como o sistema complemento; o sistema imune adaptativo envolve a ativação de linfócitos B e T antígenos-específicos. Durante um longo período, atribuiu-se ao sistema imune adaptativo a responsabilidade de gerar respostas específicas que levariam a rejeição ou a tolerância de um órgão transplantado, enquanto que o compartimento inato seria apenas uma linha de defesa específica contra os microrganismos invasores. Entretanto, trabalhos que demonstram a importância do sistema imune inato e de danos não-específicos na rejeição contribuíram para o questionamento deste tipo de visão [4].

O descobrimento dos receptores do tipo Toll (TLR; do inglês *Toll like receptors*), deixou evidente a interação entre o sistema imune inato e o adaptativo [5]. A ativação do sistema imune adaptativo depende não somente da apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC; do inglês, *Major histocompatibility complex*), mas também da indução de moléculas acessórias nas células apresentadoras de antígenos (APC; do inglês, *Antigen presenting cells*). A hipótese de que os TLR expressos nas APC poderiam regular os sinais acessórios (co-estimulação e citocinas) e, conseqüentemente, controlar a ativação de respostas adaptativas antígeno-específicas, ajudou a compreendermos melhor os mecanismos envolvidos no processo de rejeição a um órgão sólido[6].

## 1.2 Imunologia da Rejeição

A rejeição pode ser entendida como a deterioração funcional e estrutural do enxerto, mediada por anticorpos e/ou por células. Até 2007 os mecanismos de rejeição eram classificados de uma maneira generalizada e eram denominados como: rejeição hiperaguda, rejeição celular aguda, rejeição humoral aguda e rejeição crônica. Com os critérios adotados pelo consenso bianual (BANFF) realizado no Canadá (2007), a terminologia atual passou a ser classificada como: rejeição mediada por anticorpos (aguda e crônica) e rejeição mediada por células T (aguda e crônica) [7]. Muito embora esses critérios tenham sido criados com base nos achados histológicos renais, esta nomenclatura pode ser usada para os outros tipos de transplante.

A rejeição aguda mediada por anticorpos é caracterizada por uma perda precoce do enxerto, que ocorre normalmente nas primeiras 48 horas devido a presença no indivíduo receptor de anticorpos circulantes pré-formados, com especificidade para antígenos expressos nas células do enxerto. Estes anticorpos são classificados como: (i) anticorpos de baixa afinidade como a imunoglobulina M (IgM), específicos para os antígenos ABO, entre outros, e (ii) IgG de alta afinidade dirigidos contra os antígenos do MHC. Não se sabe ao certo como e por que esses anticorpos são formados, porém especula-se que possa ser por meio de contatos prévios com o antígeno ou alguns microrganismos que mimetizam essas moléculas antigênicas. A ligação destes anticorpos com as células-alvo desencadeia a ativação da cascata de coagulação, do sistema complemento e a cascata das cininas levando a trombose, isquemia e necrose do tecido. A rejeição crônica mediada por anticorpos é mais tardia, pode levar de meses a anos para se estabelecer, e é caracterizada pela deposição da molécula do sistema complemento C4d, com uma intensa fibrose intersticial, atrofia tubular e mudanças vasculares no tecido transplantado [8].



A rejeição aguda mediada por células é caracterizada por um intenso infiltrado celular composto de células mononucleares como os macrófagos, mas principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> o que leva a lesão tecidual e subsequente necrose. As diferenças entre a fase aguda e a crônica é a formação de fibrose devido aos produtos produzidos pelos macrófagos, seguido pela perda de função do órgão ou tecido [9].

Os aloantígenos desencadeiam tanto as respostas imunes celulares como humorais. Os genes polimórficos expressos codominantemente influenciam, entre outros fatores, o modo como o sistema imune do receptor irá responder ao enxerto. As principais moléculas responsáveis por desencadear a rejeição de órgãos são as moléculas do MHC, altamente polimórficas e expressas em praticamente todos os tecidos e células nucleadas. As moléculas de MHC alogênicas são reconhecidas classicamente pelas células T do indivíduo transplantado por 3 vias. A primeira é a via direta, que envolve o reconhecimento por linfócitos T do receptor, pelas moléculas de MHC expressas na superfície das APC do doador. Na via indireta, os linfócitos T do receptor reconhecem os peptídeos derivados de moléculas de MHC alogênicas e proteínas da degradação de células do enxerto, capturadas, processadas e apresentadas dentro de moléculas de MHC próprias, pelas APC do indivíduo transplantado. Os aloantígenos processados podem ser apresentados tanto por MHC de classe I como MHC de classe II e ativar células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, respectivamente [10]. Recentemente, foi comprovado a existência de uma via semi-direta, onde as moléculas da superfície celular como o MHC, podem ser transferidas das células do doador para as células do receptor. Assim as células próprias apresentariam os antígenos do doador acoplados ao MHC alogênico resultando numa resposta imune ao enxerto [11]. Até o momento, foram descritos dois mecanismos de atuação na via semi-direta, o contato célula-célula [12] ou a captação vesículas exossomais [13].

Uma vez que a ativação via TLR leva a um aumento na expressão de moléculas de MHC nas células dendríticas (DC), assim como o aumento na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40, e por consequência uma melhor ativação de células T [14], podemos especular que neste processo estão envolvidos tanto as células do sistema imune inato quanto do adquirido. Esta íntima ligação entre os antígenos de MHC e a rejeição não deixa dúvidas de que as células T tenham uma participação fundamental nesse processo, que desperta a curiosidade para um melhor entendimento sobre qual o papel dessa população celular na rejeição de enxertos.

### 1.3 Caracterização das sub-populações de linfócitos T

Em um estudo clássico da década de 80, Mosmann e colaboradores descreveram que células T CD4<sup>+</sup> estavam subdivididas funcionalmente em dois grupos: aquelas que secretam interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e aquelas que secretam interleucina 4 (IL-4). Com base nesses dados foi concluído que as células T CD4<sup>+</sup> não eram um grupo homogêneo, mas apresentavam diversas populações supostamente distintas [15].

As primeiras descrições de diferenciação celular de linfócitos T foram relatadas em 1990, com o auxílio de ensaios *in vitro*. Inicialmente, foram descritos estudos que demonstravam que células T *naives* quando estimuladas pelo receptor de células T (TCR, do inglês *T cell receptor*) na presença de IL-4, tornavam-se grandes produtoras dessa citocina [16, 17]. Em seguida, foi observado que para que ocorresse essa diferenciação, era necessária a ativação de uma via de sinalização formada pelo receptor de IL-4, a proteína STAT-6 (fator transdutor de sinal e ativador da transcrição, do inglês, *signal transducer and activator of transcription*) e o fator de transcrição GATA-3 [18, 19].

Sendo assim, ficou estabelecido que a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares (células Th, do inglês *T helper cells*) para um padrão Th2 ocorria por meio da ação da IL-

4, enquanto que a diferenciação de células para Th1 era influenciada pela ação da IL-12. Contudo, essa diferenciação foi se mostrando não ser tão simples e alguns pesquisadores observaram que a IL-12 era capaz de induzir uma produção de IFN- $\gamma$ , mediada pela expressão do fator de transcrição T-bet, levando a um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  por meio de um mecanismo de *feedback* positivo, enquanto que a sua neutralização diminuía a diferenciação de células para um padrão Th1 [20, 21].

A resposta imune a transplantes era vinculada até recentemente a uma predominância do compartimento Th1 onde as células T efetoras seriam geradas após a apresentação dos aloantígenos e migrariam para o local do transplante. Uma vez infiltradas no enxerto, as células antígeno-específicas gerariam uma resposta inflamatória local que resultaria em um subsequente aumento da migração de células não específicas ao tecido, acarretando a destruição do tecido alogênico transplantado [22]. Takiishi e colegas demonstraram a presença de um grande infiltrado de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sétimo e nono dia após o transplante, sendo que o influxo de células T CD4<sup>+</sup> era predominante. A autora sugere a existência de uma grande colaboração entre os dois tipos celulares e que a produção de citocinas pelas células T CD4<sup>+</sup> seja um importante fator no processo de rejeição do tecido (dados não publicados) [23]. Estes dados foram confirmados por trabalhos que sugerem que a presença de células T CD4<sup>+</sup> seria fundamental para rejeição de enxertos alogênicos [24, 25]. Por outro lado, existem resultados que mostram que as células T CD8<sup>+</sup> são capazes de mediar a rejeição sem a presença de células T CD4<sup>+</sup> [26]. O que ocorre na verdade é que a participação de células T CD4<sup>+</sup> é maior quando existe uma disparidade no MHC de classe II entre o receptor e o doador, enquanto que as células T CD8<sup>+</sup> participariam da rejeição mediada por disparidade no MHC classe I, sugerindo que a participação de ambos os tipos celulares são importantes para o processo de rejeição [27, 28].

Hoje sabemos que os antígenos podem ser apresentados tanto para células T CD4<sup>+</sup> quanto para T CD8<sup>+</sup>, devido a um fenômeno conhecido como apresentação cruzada, onde antígenos citoplasmáticos que seriam apresentados via MHC de classe I para células T CD8<sup>+</sup>, sejam apresentados pelo MHC de classe II para células T CD4<sup>+</sup> ou que antígenos endossomais seriam apresentados pelo MHC de classe I para células T CD8<sup>+</sup> [29]. Em 2004, Youssef e colegas mostraram que a participação de células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> na rejeição depende do tecido transplantado e do grau de disparidade antigênica. A pele pode ser rejeitada tanto por células T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> em qualquer grau de incompatibilidade genética, porém na ausência de células T CD4<sup>+</sup>, o enxerto apresentava um aumento na sobrevida [30].

Outros dois tipos de células T descritos na resposta imune aos transplantes são as células T reguladoras (papel protetor) e as células Th17 (papel efetor). No microambiente do enxerto, o fator transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ , do inglês *Transforming growth factor*  $\beta$ ) perde a sua característica supressora e a capacidade de gerar células T reguladoras, para em conjunto com a IL-6, induzir a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> numa subpopulação de linfócitos T produtores de IL-17, a qual apresenta um importante papel nos processos inflamatórios[31]. As células denominadas de Th17 expressam o fator de transcrição ROR $\gamma$ T (do inglês, *Related Orphan Receptor*  $\gamma$ ) e inibem a indução do fator de transcrição Foxp3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) nas células T reguladoras, induzida por TGF- $\beta$  na presença de IL-6 [32]. O papel efetor destas células pode ser inibido pelas citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL10 e IL-27, secretadas por células Th1 e Th2 [33, 34].

A sobrevivência e manutenção das células Th17 está diretamente relacionada com a presença de IL-23 [33, 34] e apesar de alguns pesquisadores apontarem a IL-23 como um fator importante apenas para a expansão de células Th17 (Afzali *et al.*, 2007), foi mostrado que a IL-23 também é necessária para promover um fenótipo patogênico às

células Th17, confirmando os estudos iniciais sobre a função indispensável de IL-23 nos modelos de doenças auto-imunes induzidas por células Th17. A via de sinalização STAT3/IL-6 desempenha uma função importante no desenvolvimento de células Th17 [35].

A descoberta das células Th17 levou a quebra da teoria em que a resposta imune era mediada por um balanço entre as células Th1/Th2. Isso elucidou uma série de mecanismos antes desconhecidos, porém abriu uma série de novas perguntas.

Conforme dito anteriormente, a IL-27 é uma citocina que está relacionada com a inibição de células Th17, mas também é capaz de induzir a produção de IL-10, uma outra citocina com um papel importante no bloqueio da função efetora da Th17. A IL-10 que originalmente foi descrita como um produto de células Th2 pode ser produzida por uma diversidade maior de células [36, 37], entre elas, subtipos de células T reguladoras [38]. Neste caso, a produção de IL-10 pode ser aumentada em células T CD4<sup>+</sup> estimuladas *in vitro* com IL-27. Quando a IL-27 é adicionada a uma cultura de linfócitos T polarizada para o perfil Th17, ou seja, na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, a IL-27 bloqueia efetivamente a produção de IL-17, mas não a produção de IL-10 [39].

Awashi e colaboradores descobriram que a exposição de células dendríticas a células T reguladoras promovia a diferenciação das DCs em células com características plasmocitóides, possuidoras de uma maior capacidade tolerogênica. Essas células dendríticas plasmocitóides por sua vez, induziam as células T *naïves* a se diferenciarem em células T supressoras produtoras de IL-10 [40]. Dentre os fatores solúveis produzidos pelas células dendríticas plasmocitóides encontram-se a IL-27 e o TGF- $\beta$  que, em conjunto, induzem à produção de IL-10. Esses autores também observaram uma deficiência na produção de IL-10 em camundongos deficientes para o receptor de IL-27. Com estes resultados, os autores concluíram que a IL-27 produzida pelas células dendríticas plasmocitóides é necessária para a produção de IL-10. As células T

cultivadas com as células dendríticas plasmocitóides apresentam as características de uma células T reguladoras do tipo 1, com produção de IL-10 e IFN- $\gamma$ , expressam o fator de transcrição T-bet e não expressam os fatores de transcrição GATA-3, Foxp3 e ROR $\gamma$ T [41].

O papel das células Th17 no processo de rejeição do enxerto ainda não foi bem estudado. Contudo, a sua participação em modelos de doenças auto-imunes já está bem descrita. As células T CD4<sup>+</sup> de camundongos imunizados com peptídeos indutores de EAE (do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), quando re-estimuladas, *in vitro*, na presença de IL-23 são capazes de transferir EAE, *in vivo*. Estas mesmas células, quando re-estimuladas na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, perdiam o seu papel como células patogênicas e passavam a ser capazes de prevenir a indução de EAE dependentemente de IL-10, quando transferidas em conjunto com células T patogênicas.

Assim, para contornar um processo de rejeição mediado pelo sistema imune, é necessário o uso de mecanismos supressores, como por exemplo drogas imunossupressoras, que quase sempre são tóxicas ao organismo, ou então mecanismos capazes de ativar a indução de tolerância.

## 1.4 Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica pode ser definida como um processo de homeostase do organismo, capaz de manter um estado de anergia a tecidos próprios, que ocorre tanto no timo (tolerância central) quanto na periferia (tolerância periférica). Na tolerância central, os timócitos cujos TCR se ligam com intensidade moderada a antígenos próprios sobrevivem e migram para os órgãos periféricos [42]. No entanto, quando ocorre uma interação forte do TCR com os antígenos próprios, os timócitos sofrem apoptose através da morte celular induzida por ativação ou, ainda, morrem por negligência por não se ligarem a antígeno algum (morte celular passiva). Nesta última

década, um fator de transcrição presente no timo vem ganhando um grande destaque no processo de seleção tímica por seu papel regulador na transcrição de genes tecido específicos [43]. A cada vez que este fator de transcrição, denominado de AIRE (regulador da auto-imunidade, do inglês, *autoimmune regulator*), sofre uma mutação no seu gene codificador incide no desenvolvimento de doenças auto-imunes, indicando que a sua ação na expressão de genes específicos aos tecidos é fundamental para o processo de tolerância central [43, 44]. A presença de clones auto-reativos na periferia do organismo de indivíduos saudáveis é uma evidência indiscutível de que a tolerância central não elimina totalmente os linfócitos capazes de responder ao próprio [45-47]. Por outro lado, a presença concomitante de mecanismos de regulação periféricos auxilia no controle desta auto-reatividade, potencialmente patológica.

A tolerância periférica ocorre por diferentes mecanismos que atuam em conjunto ou individualmente, sendo eles: (i) anergia (incapacidade de ativação e proliferação, desenvolvida quando o TCR reconhece um antígeno sem co-estimulação adequada) [48]; (ii) o reconhecimento de receptores inibitórios como o CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) que se liga à molécula CD28 e inibe a produção de IL-2, levando à consequente apoptose do linfócito [49, 50]; (iii) apoptose devido a uma estimulação antigênica repetida dos linfócitos T [51]; (iv) ignorância das células T (quando estas células não encontram antígenos para se ligarem) [52]; (v) indução de tolerância por células T reguladoras [53-55] e (vi) mudança no perfil de citocinas produzidas, alterando o perfil da resposta imune [56, 57].

## 1.5 Células T reguladoras

As células com papel regulador surgiram na década de 70 e descritas inicialmente por Gershon e Kondo como células supressoras. Porém, foi somente a partir dos anos 90

que a existência destas células passou a ter uma aceitação maior por parte dos pesquisadores [58].

Os mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica despertaram o interesse da comunidade científica para uma variedade de células descritas por apresentarem uma atividade reguladora, dentre elas, estão as células NKT (do inglês, *Natural Killer T cell*) [59] e NK [60], células CD8<sup>+</sup> [61], CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> [62], CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [63] CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [64] e células T  $\gamma\delta$  [65, 66]. Groux e colaboradores descreveram em um modelo *in vivo* que a presença de uma população de células T específicas ao antígeno possuíam a capacidade de suprimir a proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, em resposta a um determinado antígeno e prevenir o desenvolvimento de uma colite auto-imune em camundongos SCID (modelo de imunodeficiência severa combinada de camundongos; do inglês, *Severe combined immunodeficiency*). Essas células caracterizadas pela alta produção de IL-10, foram chamadas de células T reguladoras do tipo 1 (Tr-1) [67].

Em 1994, Chen e colaboradores descreveram tipo de célula T, denominada de células Th3 e que apresentavam características reguladora, capazes de inibir a proliferação de clones de células T por meio de uma alta produção de TGF- $\beta$  [68]. No ano seguinte, Sakaguchi e colaboradores identificaram um terceiro tipo de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras as quais expressavam a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, com capacidade de controlar células T auto-reativas *in vitro* e *in vivo*. Esses estudos resultaram na identificação de uma população de células T com capacidade de suprimir e ou regular, outras populações celulares, que foram chamadas inicialmente de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, conhecidas como células reguladoras naturais, originam-se no timo e constituem cerca de 5-10% de todas as células T no sistema murino, exibindo uma potente atividade reguladora (Sakaguchi *et al*,1995). Essas células T



reguladoras suprimem a proliferação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e células T CD8<sup>+</sup>, assim como a secreção de IFN- $\gamma$  *in vitro* bem como *in vivo* [69]. Células com uma função supressora similar foi encontrado em humanos [70]. Essas células desempenham um papel importante na regulação da resposta imune através da inibição de células T auto-reativas. Mais recentemente, foi identificada nessas mesmas células uma alta expressão do fator de transcrição chamado Foxp3 [71]. O Foxp3 é um fator da proteína escurfina pertencendo à família de fatores de transcrição *forkhead* [72]. A regulação de sua expressão e sua importância dentro da população de células T reguladoras serão descritos posteriormente.

Em murinos, a expressão de Foxp3 em células T é considerada um bom marcador das células T reguladoras. Diferente do que é observado em camundongos, em humanos o Foxp3 pode ser induzido transitoriamente em células T ativadas, descaracterizando-o como um marcador específico do estado de regulação [73, 74]. Assim, apesar de ser importante para a função supressora das células T reguladoras, o Foxp3 também pode ser induzido em células T ativadas via TCR [75]. Além disso, em humanos, alguns tipos de células T reguladoras que não expressam Foxp3 foram relatados [37].

A manutenção e sobrevivência das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> é regulada pela IL-2. O uso *in vitro* de anticorpos anti-IL-2 anula completamente a função supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [76], enquanto que a neutralização *in vivo* da IL-2 inibe a proliferação homeostática de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> periféricas em animais linfopênicos. A importância de IL-2 na geração e expressão de Foxp3 no timo também tem sido investigada. Porém, a disparidade dos resultados encontrados não permite estabelecer um papel da IL-2 na ontogenia das células T reguladoras naturais. Em um trabalho publicado por Fontenot e colaboradores, os autores não encontraram uma relação entre a expressão de Foxp3 em timócitos e sinais mediados pela IL-2 [77]. Em contraste a esse

trabalho, foi mostrado posteriormente que a interação da IL-2 com o seu receptor parece ser essencial para promover a geração de células T reguladoras no timo, bem como regular a expressão de CD25 e Foxp3 [78]. Portanto, não é possível estabelecer precisamente qual o papel da IL-2 na geração células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, mas sim sua importância para a manutenção dessas células na periferia.

Diversas moléculas de superfície identificadas e associadas com as células T reguladoras murinas e humanas, como o CTLA-4 [79], neutropilina-1 [80], LAG-3 (do inglês: *Lymphocyte activation gene-3*) [81] GITR (do inglês: *Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Family-Related Receptor*) [82], receptores de quimiocinas CCR4 e CCR8 [83], L-selectina [84] têm se mostrado importante na função supressora das células T reguladoras no sistema murino.

As células T reguladoras podem atuar suprimindo a resposta imune tanto por meio de fatores solúveis como o TGF- $\beta$  e a IL-10, quanto por um mecanismo dependente do contato célula a célula, mediados pelo CTLA-4 [85-87]. Recentemente, foi descrito uma forma de supressão mediada pelas células T reguladoras que se baseia na capacidade dessas células consumirem os fatores de crescimento presentes no microambiente, como a IL-2, privando as células efetoras desses fatores. A depleção de IL-2 realizada pelas células T reguladoras induz as células efetoras a entrarem em apoptose [88]. As células T reguladoras possuem uma maior quantidade de receptores de alta afinidade para IL-2 o que as dá uma vantagem competitiva em relação as outras células do sistema imune, além de fornecer um mecanismo de supressão adicional, a secreção de IL-10 induzida por IL-2 [89]. Estudos realizados em camundongos perforina<sup>-/-</sup>, os quais possuem defeitos nos mecanismos de imunorregulação, sugerem que a granzima B possa atuar mediando à supressão via um mecanismo perforina-independente e contato-dependente, embora não se saiba como a granzima B atuaria na ausência de perforina [90]. Outro mecanismo de supressão descrito é mediado pelo

cAMP (do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*). Nesse modelo de supressão contato-dependente, as células T reguladoras apresentam altas concentrações de cAMP e, por meio de junções do tipo Gap, o cAMP presente nas células T reguladoras é transportado para outra célula, suprimindo sua resposta [91]. O mecanismo pelo qual o cAMP age ainda não é completamente conhecido, mas parece estar relacionado com a inibição da produção de IL-2 mediada pela ICER (do inglês: *cAMP inducible early repressor*) [92-94].

O metabolismo de adenosina também foi descrito como um processo de supressão mediado pelas células T reguladoras. A regulação do catabolismo extracelular de ATP, pelas células T reguladoras, leva à geração de adenosina. O passo inicial é realizado pelo CD39 que quebra ATP em ADP e ADP em AMP. O AMP é rapidamente degradado a nucleotídeo pelo CD73. A adenosina gera seus efeitos supressores ao se ligar em receptores purinérgicos acoplados à proteína G, presente em células T, o receptor A2A [95]. Outros mecanismos de supressão também foram descritos, como na geração de células T reguladoras gerenciado por células dendríticas plasmocitóides expressando IDO (do inglês, *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*). Essas células T reguladoras estimulariam a expressão de PD-L em outras células dendríticas que ao se ligarem a PD-1 (do inglês, *Programmed Death 1*), presente em células T efetoras, induziria apoptose nessa população [96]. Como pode ser observado pela grande variedade de mecanismos supressores, diversos são os caminhos para a tolerância e imunorregulação. É provável que diferentes indivíduos possuam mecanismos singulares de regulação que os conduzem a diferentes desfechos dos diversos processos imunológicos. A compreensão mais global desses mecanismos pode gerar conhecimentos para que as intervenções clínicas sejam mais eficazes.

O potencial terapêutico dessas células em prevenir a rejeição de transplantes tem sido de grande interesse. Essas células podem ser manipuladas e geradas *in vitro*, desta

forma poderiam ser infundidas nos receptores de transplante, assim aumentando a sobrevivência do tecido enxertado [97].

## 1.6 Células-tronco

As células-tronco (CT) são definidas como uma população de células com capacidade de permanecer em um estágio indiferenciado e que ao gerar células filhas, tem como características gerar células idênticas. Toda vez que uma célula não tronco se divide por mitose, ela dá origem a duas células filhas semelhantes a ela. Em um processo de divisão assimétrica, como ocorre com as CT, tem-se uma separação citoplasmática diferenciada gerando uma célula idêntica a original, que se expandirá clonogenicamente, e outra célula progenitora comprometida com uma linhagem específica. A divisão assimétrica também ocorre no desenvolvimento do zigoto, em suas primeiras divisões, e na espermatogênese e oogênese [98].

Outra definição importante para as CT é relacionada à sua origem, como células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA). A principal diferença entre as CTE e CTA está no conceito de potencialidade, definida como a capacidade das CT em gerar células filhas diferentes, de acordo com o folheto germinativo. Em princípio, as CTE possuem maior potencialidade que as CTA, pois conseguem originar células filhas dos três folhetos germinativos.

Sendo assim, as células tronco são classificadas como: *totipotentes* – são as CT com capacidade dar origem a um novo organismo, como é o caso de células do zigoto; *pluripotentes* – células que podem dar origem a células dos três folhetos germinativos; *multipotentes* – células que já possuem certo grau de especialização, que as permite apenas gerar células de um folheto germinativo, como as CTA mesenquimais da medula óssea e *unipotente ou progenitora* – células que podem produzir um único tipo

celular que mantêm a capacidade de auto-replicação, o que a distingue de uma célula não tronco, como as CTA residentes em órgãos [99].

## 1.7 Células-tronco adultas

Por definição, as CTA (auto-renovação e potencialidade), podem ser encontradas em todos os órgãos e diversos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo, fígado, rim, placenta, cordão umbilical, entre outros [100]. Mais do que se diferenciar, as CTA são responsáveis pela manutenção da homeostase e integridade do tecido. As CTA são definidas como CT multipotentes, ou seja, quando ao se dividirem podem dar origem a células de apenas um folheto germinativo. Por exemplo, se a CTA estiver no cérebro, ela se dividirá e dará apenas origem a células da ectoderme.

No tecido, as CTA localizam-se em determinadas regiões chamadas de nichos [101]. Os nichos são regiões específicas nas quais as CTA se mantêm em estado quiescente. Durante o desenvolvimento humano, as CT se estabelecem nesses nichos, que as sustentam e as regulam quanto à proliferação. As outras células presentes no nicho geram um abrigo para as CT impedindo que as mesmas sofram diferenciação, estímulos apoptóticos ou qualquer outro estímulo que as levem a uma diferenciação celular. Além disso, o nicho também previne a excessiva produção de CT, que poderia resultar na formação de tumores [101, 102].

Especula-se que o papel das CTA seja de regeneração [103]. No caso de uma lesão, as CTA que se encontram quiescentes em seus nichos, receberiam sinais do meio ambiente que induziriam a sua ativação, divisão e migração para o local lesado. Todo este mecanismo ocorre devido à liberação de quimiocinas que atraem essas células para região lesada.

Alguns mecanismos de ação regenerativas das CTA incluem: a *transdiferenciação* – uma vez que a célula é indiferenciada e que pode dar origem a outras células, pode-se sugerir que ao encontrar a célula lesada ela se diferencie para repor essa célula que está morrendo. Entretanto esse mecanismo é muito complexo e pouco sugestivo, uma vez que já se pode observar melhora funcional em muitos modelos experimentais em apenas 24 horas, que é um tempo muito curto para a CTA se diferenciar; a *fusão* – alguns autores sugerem que as CTA possam se fundir a célula que está morrendo e então auxiliar no reparo. Diversos estudos, entretanto, encontram poucas CTA no tecido lesado, analisados por diversas técnicas; e o *parácrino* – CTA no tecido lesado são ativadas pelos estímulos inflamatórios e secretam diversos fatores tróficos que podem não só auxiliar a célula que está morrendo como podem também estimular a CT no local [104].

Atualmente se acredita que o papel parácrino da CTA seja o principal mecanismo de ação. Diversas são as substâncias secretadas pelas CTA que seriam as responsáveis por suas ações regenerativas, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas [105-107]. Dentre as CTA mais estudadas temos as CT oriundas da medula óssea: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco estromais da medula óssea (CTM).

## **1.8 Células-tronco Mesenquimais (CTM)**

As CTM são células-tronco clonogênicas e não hematopoiéticas, presentes na medula óssea e capazes de diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares do tipo mesoderma como, por exemplo, osteoblastos, condrócitos, células endoteliais e diversas células do tipo não-mesoderma como células neuronais. Já existem métodos para isolar as CTM baseados em características físico-químicas, como por exemplo, a aderência a plásticos ou a outros componentes da matriz extracelular. Devido ao seu isolamento

fácil e extensivo potencial de diferenciação, as CTM estão entre as primeiras células-tronco a serem introduzidas na prática clínica [108].

As CTM têm grande potencial para ser empregado em terapias celulares, visto sua facilidade de obtenção, expansão e diferenciação, além de relativa aceitação do ponto de vista ético [109-111]. Estas células podem se diferenciar em uma variedade de células não hematopoiéticas. Foi demonstrado que as CTM, quando injetadas em animais, são capazes de migrar para a área da lesão e restaurar a função do tecido [109]. Além disso, as CTM podem repopular órgãos danificados e serem usadas como vetores de transporte gênico e de fatores de crescimento para sítios privilegiados depois da transdução. Esta medicina reparativa ou regenerativa está a ser atualmente empregada no tratamento de diversas doenças hematológicas neoplásicas, ou não, e vem apresentando resultados promissores em outros campos de atuação tais como coração, artérias e cérebro [108, 112, 113]. Morfologicamente, as CTM são células fusiformes, com formato semelhante a fibroblastos, e apresenta caracteristicamente, no início de seu crescimento *in vitro*, a formação de unidades formadoras de colônias (CFU). Fenotipicamente, elas são negativas para os marcadores de superfície hematopoiéticas CD34, CD45, CD14, CD133, e positivas para CD29, CD73, CD90, CD105, CD166, CD54, CD55, CD13 e CD44 [109, 113, 114].

### **1.9 CTM e a inibição da resposta imune**

Um estudo mostrou a capacidade das CTM em evitar a rejeição a aloenxertos em modelos animais [115]. Bartholomew e cols. (2002) mostraram em modelo animal que a administração *in vivo* de CTM alogênicas prolongava a sobrevivência de enxerto de pele de um terceiro doador, suprimindo a resposta de células T [116]. Anos depois, Aggarwal e cols. mostraram o potencial dessas células em criar um micro-ambiente tolerogênico, levando ao aceite do tecido transplantado, sugerindo também uma participação de

células reguladoras T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [117]. Entre os mecanismos que poderiam contribuir para este efeito, estão a carência de moléculas de classe II do MHC [118] e de moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86 e CD40 [119]. De forma interessante, a transfecção das CTM com as moléculas CD80 e CD86 não reverteu esta capacidade de inibir resposta imune [120]. Lyushnenkova e cols. demonstraram que na verdade, esta capacidade supressora estava relacionada à produção de citocinas solúveis como IL-10 e não dependia da presença destas moléculas co-estimulatórias [120].

Um outro mecanismo descrito envolveria a participação das células dendríticas. Sabe-se que células dendríticas imaturas podem expandir populações de células Treg [121, 122], e acredita-se que este processo contribuiria para a sobrevivência do enxerto [123]. A capacidade das células dendríticas em induzir tolerância periférica é um dos mecanismos pelos quais as CTM poderiam manipular a imunidade adaptativa. Deste modo, as CTM poderiam prevenir respostas alogênicas através da modulação das células dendríticas ou diretamente sobre as células T [124]. Em 2005, Maccario e colegas descreveram a capacidade de CTM humanas de induzir a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> para um fenótipo supressor ou regulador [125]. Recentemente, Pierdomenico *et al.* demonstraram que estas células inibiam a resposta proliferativa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> frente a estímulo policlonal em quase 90% [126].

A aquisição das CTM de medula é um método trabalhoso e dolorido para o paciente, o que torna as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC, do inglês *Adipose-derived stem cells*) uma atraente alternativa de obtenção de CTM para uso em engenharia tecidual e aplicações clínicas [127]. Sua relativa abundância, e fácil acesso nos tecidos adultos, fazem dessas células as candidatas ideais para uma terapia celular. Assim, a proposta para o uso dessas células no reparo de tecidos injuriados, ou depois de apropriada manipulação, tratamento de algumas desordens está a ganhar novos defensores a cada dia [100, 128, 129].



Um estudo minucioso realizado pelo grupo do Pesquisador Antoine Blancher comparou a capacidade imunomoduladora de CT derivadas da medula óssea com as ADSC. Nesse estudo eles concluíram que as duas células possuíam um potencial imunossupressor, pois ambas foram capazes de conter a proliferação de linfócitos T, frente a estímulos alogênêicos ou policlonais. Eles mostraram também que essa supressão necessitava de um contato celular e era mediada por substâncias solúveis, diferentes da IL-10 e TGF- $\beta$  [130]. Isso nos levou a pensar que as ADSC podem ser de grande utilidade, uma vez que é encontrada em grande quantidade e com facilidade de obtenção. Assim sendo, nós decidimos estudar o papel dessas células no modelo de transplante de pele. Neste trabalho de doutorado, nós tínhamos como hipótese que as ADSC induziriam uma tolerância imunológica em transplante experimental por influência no balanço de células T reguladoras (Treg) e efetoras (Th1/Th17).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

Avaliar a capacidade de induzir tolerância a enxertos de pele pelo tratamento com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC).

### 2.2 Específicos:

I – Avaliar se o tratamento com as ADSC é capaz de induzir tolerância a um enxerto de pele alogênico;

II – Caracterizar a capacidade imunomoduladora das ADSC em suprimir a resposta imune alogênica;

III - Avaliar se após o tratamento com as ADSC, houve uma expansão na frequência de células T reguladoras nos linfonodos drenantes; e

IV – Quantificar a expressão das moléculas Foxp3, IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-2 nos linfonodos e no enxerto dos camundongos transplantados tratados ou não com as ADSC.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais de experimentação**

Camundongos isogênicos machos de 8 a 10 semanas de idade, das linhagens CBA/J e C57BL/6 foram obtidos no biotério de criação do Instituto de Ciências Biomédicas. Os CBA/J foram utilizados como doadores de tecido adiposo e tecido cutâneo enquanto os C57BL/6 foram utilizados como receptores. Os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. (Protocolo nº 010 folha 42 livro 2). Para cada ensaio foram utilizados 5 animais por grupo, representativos de dois experimentos distintos.

#### **3.2 Isolamento, caracterização, diferenciação das células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongos**

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) de camundongos foram isoladas seguindo o método de aderência ao plástico, descrito anteriormente [131]. Breve, as células de gordura foram obtidas depois da retirada do tecido adiposo abdominal dos camundongos. Após digestão com colagenase II (Sigma) por 30 minutos a 37 °C. As células foram recuperadas após centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e o botão celular foi ressuspenso em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com baixa dose de glicose, suplementado com 10% de SBF (Hyclone), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco), 2,4 mg/mL de HEPES (Sigma), e 3,7 mg/mL de NaHCO<sub>3</sub> (Synth). As células foram contadas, transferidas na concentração de 1 x 10<sup>7</sup> células/mL em garrafas de 75 cm<sup>3</sup>, e incubadas a 37 °C em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado após 4 dias do isolamento para remoção das células hematopoiéticas não aderidas. Após 3 dias as células foram subcultivadas por

tratamento com 0,05% de tripsina e 0,53 mM EDTA por 2 minutos, lavadas com meio de cultura DMEM suplementado, para remoção de resíduos de tripsina e coletadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos e transferidas para frasco de 25 cm<sup>3</sup> para crescimento. A cada passagem quando as células alcançavam uma confluência de 80 a 90% as células foram tripisinizadas como descrito anteriormente e transferidas para novas garrafas em menor concentração. Quando as células estavam na passagem 5 (P5) foram realizados ensaios de diferenciação, para a caracterização funcional, e citometria para caracterização fenotípica das ADSC. Para tanto foram utilizados os seguintes parâmetros:

### *Caracterização fenotípica*

Na passagem 5 uma parte das células obtidas foram submetidas a análise fenotípica por citometria de fluxo (FACS). Após centrifugação e obtenção do botão celular essas células foram distribuídas em tubos distintos ressuspensas em tampão de FACS (PBS 1%, SFB 3% e 0,02% azida sódica) e centrifugas a 1500 rpm por 5 minutos, subsequente as células foram marcadas com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos para as seguintes moléculas: CD73 PE, CD44 PE, CD31 FITC, CD34 FITC, CD45 PerCP, CD11c PE-CY<sup>5</sup>, F4/80 PE, CD80 PE e CD86 FITC (BDBioscience). As células foram incubadas a 4 °C por 30 minutos, e após isso ressuspensas em 400 µL de tampão de FASC, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ressuspensas novamente 300 µL e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II. Para análise dos resultados utilizamos o software FlowJO 7.5. Os dados foram plotados como histograma sendo a porção positiva compensado pelos controles isotípicos para os determinados fluorocromos.

### *Diferenciação adipogênica*

ADSC na terceira passagem na densidade de  $2-5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em placas de 6 poços com meio de cultura DMEM até atingirem confluência. Nesse ponto, o meio de cultura DMEM foi trocado por o meio de cultura de indução de adipogênese que consiste em meio DMEM (alta glucose, 4,5 g/L) suplementado com 1 µM de dexametasona, 0,5 mM de indometacina, 10 µg/ml de insulina, 100 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma, USA) e 10% de SBF, por três dias. Em seguida, o meio de indução de adipogênese foi trocado por um meio de manutenção contido de DMEM (alta glucose 4,5 g/L) suplementado com, 10 µg/mL de insulina e 10% de SBF. Essa estimulação foi repetida duas vezes, num total de 18 dias de tratamento [132]. As células de controle foram cultivadas no meio DMEM suplementado apenas com 10% SBF. Após isso foi retirado todo o meio lavado com PBS 1% e depois as células foram fixadas com paraformaldeído 10% por 20 minutos, lavadas com água destilada e coberto com uma camada de *Oil Red O* por 5 minutos e lavar com água. A diferenciação das células pode ser observada pela coloração laranja dos vacúolos de gordura em microscópio óptico.

### *Diferenciação osteogênica*

A diferenciação osteogênica foi induzida na terceira passagem da cultura das ADSC seguindo protocolos previamente publicados [100, 133]. As ADSC foram incubadas com meio de cultura contendo 100 nM dexametasona, 10 mM de sódio β-glicerofosfato e 0,05 mM de ácido ascórbico (Sigma, USA). As células na concentração de  $5 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> foram cultivadas separadamente em cada meio de cultura por 28 dias e o meio foi trocado a cada 3 dias. No 28º dia, metade das células cultivadas em cada meio foi incubada com 10 nM 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (vitamina D, Biomol Research Laboratory, Plymouth Meeting, PA, USA) por mais 72 horas. Após isso foi retirado todo

o meio lavado com PBS 1% e depois as células foram fixadas com paraformaldeído 10% por 20 minutos, lavadas com água destilada e coberto com uma camada de *Alizarin Red S* por 5 minutos e lavada novamente com água. A diferenciação osteogênica pode ser determinada pela atividade da fosfatase alcalina corada com prata (Von Kossa) e evidenciada por microscopia.

### *Diferenciação condrogênica*

As ADSC foram plaqueadas como descrito acima e induzidas para diferenciação em condrócitos em meio específico contendo: 6,5 µg/mL de insulina, 10 ng/mL de TGF-β 1 e 50 nM de Ácido Ascórbico 2 – fosfato, durante 3 semanas. As alíquotas dos estímulos de diferenciação devem ficar congeladas e adicionadas a cada troca, pois podem perder sua atividade em geladeira. Após isso foi retirado todo o meio lavado com PBS 1% e depois as células foram fixadas com paraformaldeído 10% por 20 minutos, lavadas com água destilada e coberto com uma camada de Safranina O por 5 minutos e lavar com água. A matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos pode ser observada pela coloração vermelha em microscópio óptico.

### **3.3 Isolamento da Fração mononuclear de medula óssea**

A fração mononuclear da medula óssea foi obtida depois da retirada da medula óssea da tíbia e fêmur dos animais. Com auxílio de uma tesoura retiramos as epífises e com uma seringa e agulha de 0,45 x 13 contendo PBS realizamos o *flush* no interior da medula. Obtida a medula, com o auxílio de uma pipeta desfizemos o tecido para obtenção de uma suspensão celular. Colocamos essa suspensão em sobre um gradiente de 2 mL de Histopaque (Sigma, Sant Louis, USA) e centrifugamos por 20 minutos a 2200 rpm sem aceleração e sem freio. Após isso removemos o anel de células mononucleares, lavamos, contamos e injetamos  $2 \times 10^5$  células via intraperitoneal.

### 3.4 Transplante de Pele

O transplante de pele foi realizado segundo a técnica descrita por Markees *et al.* (1997), porém por nós modificada. Os camundongos doadores CBA foram sacrificados, e com o auxílio do bisturi a pele da cauda foi removida, cortada em quadrados de 1 cm de diâmetro sendo os cantos abaulados. A pele após preparada foi mantida em solução salina tamponada (PBS) na placa de petri sobre gelo até o momento do uso. Os camundongos receptores C57BL/6 foram anestesiados com 350  $\mu$ L (via i.p.) da mistura de cloridrato de ketamina (0,5%) e cloridrato de xilazina (0,3%) em PBS. Os animais tiveram o dorso depilado, e fizemos a assepsia com etanol 70%. Uma pequena fissura “leito” para o enxerto na região dorsal foi preparada removendo-se uma área da epiderme e derme até o nível do músculo intrínseco, no tamanho do enxerto. Os enxertos foram colocados no “leito”, suturados com fio de nylon 6.0 com agulha triangular e cobertos com band-aid. A sobrevida do enxerto foi monitorada diariamente após o 7º dia do transplante por avaliação visual. A rejeição foi definida a partir do dia em que 90% do enxerto apresentava-se necrosada.

### 3.5 Citometria de Fluxo

#### *Imunofenotipagem de Células T Reguladoras*

Inicialmente realizamos a marcação das moléculas de superfície celular. A suspensão celular obtida dos linfonodos foi primeiramente incubada com 80  $\mu$ L de FcBlock (clone 24G2D) por 30 minutos a 4 °C, posteriormente foi adicionado anticorpos monoclonais específicos, CD4 (FITC) e CD25 (PE), incubados a 4 °C por mais 30 minutos. Após isso adicionamos 500  $\mu$ L de FACS buffer aos tubos e os mesmos centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos foram agitados no vórtex por 5 segundos para desprender as células. Depois de realizada a marcação das moléculas de superfície, realizamos a marcação intracelular do

Foxp3 seguindo especificações do fabricante EBioscience®. Os dados foram analisados usando o software FlowJO 7.5.

### *Citocina Intracelular*

Os linfonodos obtidos dos animais transplantados foram macerados e a suspensão celular obtida foi centrifugada a 1500 rpm 5 minutos para obtenção do botão celular. Após isso as células foram plaqueadas em placa de 96 poços fundo U num volume final de 200  $\mu$ L. Foi adicionado na concentração de 1  $\mu$ L/mL de brefeldina A, acetato miristato de forbol e ionomicina por 6 horas em estufa a 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>. Após estímulo as células foram marcadas com anticorpos de superfície como descrito anteriormente e para marcação das citocinas intracelulares utilizamos o Kit da BD Bioscience. Os anticorpos para marcação intracelular foram anti: IL-2 PE, IL-10 APC, IL-17 PE e IFN- $\gamma$  FITC (Biolegend). Quando utilizamos os animais C57BL/6 Foxp3GFP<sup>+</sup> utilizamos anti IFN- $\gamma$  PE (BD Bioscience).

## **3.6 PCR em Tempo Real**

### *Extração de RNA*

O RNA foi extraído pelo método descrito por Chomczynski *et al.*, o qual se utiliza a solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total [134]. Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe as células mantendo a integridade do RNA. Foi adicionado 1 mL de trizol para  $1-4 \times 10^6$  células. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio RNase *free*, puro, por mL de trizol. Após agitação e incubação por 3 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 13000 g, por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação há uma separação de fases e o RNA se encontra localizado na fase aquosa. Essa fase foi transferida para um novo tubo e precipitada com 1000  $\mu$ L de álcool isopropil por mL de trizol. Incubou-se por 10



minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se por 13000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de etanol 70 %. Centrifugou-se a 13000 g por 5 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 12 µL de água tratada com DEPC q.s.p (Invitrogen, CA, USA). Desse estoque, 1 µL foi usado para a quantificação em espectrofotômetro e 1 µl para análise em gel de agarose 1,2%. Este material foi mantido a -80 °C até o momento da transcrição.

### *Quantificação de RNA*

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280 nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão maiores que 1,7.

Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,2 %, RNase *free*, para a visualização da integridade das amostras, observando as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA. Como marcador de massa moléculas usou-se o *High DNA Mass ladder* (Invitrogen, CA, USA). As amostras com RNA degradado foram descartadas e recoletadas.

### *Tratamento com DNAase*

As amostras de RNA foram tratadas com DNAase para que não houvesse interferência do DNA no PCR em tempo real. Foi usado 1 µL da enzima DNAase-I por 1 µg de RNA. Foram adicionados 3 µL de DNase, 3 µL de tampão 10 x RNAase *free* e 3 µg de RNA, completando-se o volume com água tratada com DEPC q.s.p para 30 µL. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período,

adicionou-se uma solução de EDTA para bloqueio, misturou-se e incubou-se por 10 minutos a 65 °C.

### *Transcrição reversa*

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa foi feita com 3 µg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1µL de oligo dT (500 µg/mL), 1µL de dNTP (2,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, resultando em uma concentração final de 10 mM) e água 20 µL. Esta mistura foi aquecida a 65 °C por 5 minutos em termociclador (Eppendorf EPS Gradient, USA). Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4 µL de tampão de transcrição 5 × 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de inibidor de RNase (40 U/µL) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram, então, colocadas em termociclador a 42 °C por 2 minutos, nessa etapa fez-se uma pausa para a adição da enzima transcriptase reversa (200 U/µL). Após essa pausa a reação continuou a 42 °C por 50 minutos seguidos de 70 °C por 15 minutos.

### *Reação de PCR em tempo real*

Os genes IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, Foxp3, HO-1, IFN-γ e TGF-β foram quantificados quanto à sua expressão através de PCR em tempo real, em aparelho ABI PRISM 7300 sequence detection system (Applied Biosystem, EUA). Cada amplificação foi preparada com 5 µg de cDNA. A amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 1 µL de cDNA a uma concentração de 5 ng/µL, 0,5 µL de sonda, 4 µL TaqMan® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e 3,5 µL de água livre de DNase/RNase (Sigma). As condições de amplificação foram padronizadas para cada transcrito. Uma relação comparativa entre os ciclos da reação (ct) foi usada para determinar a expressão gênica, em relação ao controle HPRT (gene housekeeping,

calibrador). Dessa maneira, níveis arbitrários de mRNA foram expressos como uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador. Para cada amostra, os valores (ct) dos genes alvo foram normalizados e o valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo do grupo tratado em relação ao não tratado foi calculado utilizando a expressão  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Previamente descrita por K. Livak – PE – Applied Biosystems; Sequence Detector User Bulletin 2) [135].

**Tabela 1: Referência das sondas utilizadas neste protocolo.**

HPRT	Mm 00446968_m1	FOXP3	Mm 00475156_m1
IL-2	Mm 00434236_m1	HO-1	Mm 00516004_m1
IL6	Mm 00446190_m1	IFN- $\gamma$	Mm 00801778_m1
IL-10	Mm 99999062_m1	TGF- $\beta$	Mm 03024053_m1
IL-17	Mm 00439619_m1		

### 3.7 Isolamento das células T CD4+

As células T CD4<sup>+</sup> foram isoladas do linfonodo drenante dos animais utilizando microesferas magnéticas que se ligam a molécula CD4 (Miltenyi, EUA) nos linfócitos T. Os linfonodos foram macerados utilizando lâminas histológicas esmerilhadas e posteriormente a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos para obtenção do botão celular. Desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos em 5 mL de uma solução PBS 1 % + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA (Tampão separação). Contar as células e obter uma suspensão celular de 10<sup>7</sup> células/mL, adicionar 10 µL das microesferas magnéticas/mL de suspensão, incubar por 20 minutos a 4 °C. Lavar as células com PBS 1 % + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA e centrifugar a 1500 rpm 5 minutos e ressuspender em 1 mL do tampão separação e iniciar o preparo da coluna LS (Miltenyi, EUA). Já no campo magnético lavar a coluna com 5 mL do tampão (não deixar a coluna secar) e iniciar a seleção negativa colocando a suspensão de células na coluna. Aos poucos ir adicionando 10 mL do tampão até lavar bem a coluna, retirar a coluna do campo magnético e lavar a coluna (seleção positiva) com 10 mL do tampão e subsequente com a ajuda do êmbolo remover toda a amostra. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspender o botão celular em 2 mL de DMEM suplementado (descrito acima) e reservar para o uso.

### 3.8 Ensaio de Resposta linfoproliferativa

A reação mista de leucócitos (MLR) foi realizada conforme a técnica padronizada e implantada no nosso laboratório. Células dendríticas foram obtidas de esplenócitos totais utilizando microesferas magnéticas (descrito acima) do doador alogênico (CBA-J) e foram irradiadas (3000 rads) e reservadas. As células T CD4<sup>+</sup> obtidas acima foram marcadas com CFSE. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em PBS 1 % BSA na proporção de 1 x 10<sup>6</sup>/mL e posteriormente adicionou-

se 1  $\mu$ L/mL de CFSE e incubamos por 10 minutos a 37 °C em banho-maria. Após isso adicionamos 5 vezes o volume com meio DMEM gelado e incubamos por 5 minutos em gelo. Subseqüente centrifugamos as células a 1500 rpm por 5 minutos e o botão celular foi ressuspenso em meio suplementado. Para o ensaio, plaqueamos as células em placa de 96 poços fundo U (Costar, Cambridge, MA, EUA) na proporção 1:1 ( $2 \times 10^5$ ) num volume final de 200  $\mu$ L de meio de cultura suplementado. No ensaio de supressão foi acrescida  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  respectivamente de ADSC. As células foram cultivadas em triplicata por 96 horas dias em incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. No final do período de incubação, as células foram recolhidas e a proliferação estudada quanto divisão e perda da intensidade de fluorescência em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

### 3.9 Ensaio de citocinas por Bioplex

Os sobrenadantes coletados para a análise no Bioplex foram congelados a - 80 °C até o momento do uso. O painel usado foi o Mouse Th1/Th2 (Bio Rad, Hercules, CA) para detecção de citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, 20  $\mu$ L do soro dos animais foi diluído em 60  $\mu$ L “Bioplex Mouse Serum Diluent” (Bio Rad, Hercules, CA). O filtro da placa multiwell 96 foi lavado com Bioplex Assay Buffer (Bio Rad). Em seguida, foram adicionados os beads conjugados com anticorpos anti-citocinas, lavados com Bioplex Wash Buffer, sendo posteriormente adicionados sobrenadantes diluídos. Seguido de uma incubação de 2 horas, a placa foi novamente lavada com o Bioplex Wash Buffer, sendo então adicionado a cada poço o anticorpo biotinilado de detecção para um epítipo diferente da citocina, formando então um sanduíche de anticorpos, incubado por 1 hora. Após esse período, novas lavagens com o Bioplex Wash Buffer foram realizadas, sendo então adicionado Streptavidin conjugada com PE, que se liga ao anticorpo biotinilado, por 30 minutos. Novas lavagens foram realizadas com Bioplex

Wash Buffer, e os beads foram ressuspensos com Bioplex Assay Buffer e analisados no Bioplex 200 Suspension Array System/ Luminex (Bio Rad, Hercules, CA) através do Software Bio-Plex Manager, versão 4.1 (Bio Rad, Hercules, CA). Os dados observados são referentes à no mínimo 100 *beads* por citocina.

### **3.10 Análise Histológica**

Após retirada do enxerto, o material foi fixado em formol tamponado a 10% até a montagem do bloco de parafina. Os cortes foram processados pelo técnico em histologia Paulo Albe e depois corados com hematoxilina-eosina (H.E). Para os ensaios de Picro-sírius as lâminas foram enviadas para a Patologista Profa. Rosana Rosa Corrêa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que fez o processo de coloração e também avaliou os cortes de H.E. A microscopia foi realizada em microscópio óptico Leica e analisadas pelo software Leica Qwin.

### **3.11 Análise estatística**

Para os dados da sobrevida adotamos o Logrank Test e para as análises comparativas entre os grupos, foi empregado o teste t de Student (Mann Whitney test) para comparação entre duas variáveis e o Anova (Kruskal-Wallis test) juntamente ao Teste de Dunn (Multiple Comparison Test) para comparar todos os grupos. Para todos os testes, foi estabelecido um nível de significância de 5%, rejeitando-se a hipótese da nulidade quando  $p < 0,05$ . Os resultados também foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão SEM.

## 4 RESULTADOS

Conforme proposto por Friedenstein e colegas em 1970, as ADSC têm como características sua aderência ao plástico e a diferenciação para distintos tipos celulares, como: osteócitos, adipócitos, condrócitos, miócitos, entre outros. Para tanto, primeiramente, obtivemos as células do tecido adiposo dos animais e as caracterizamos como descrito anteriormente para posterior utilização nos experimentos [136].

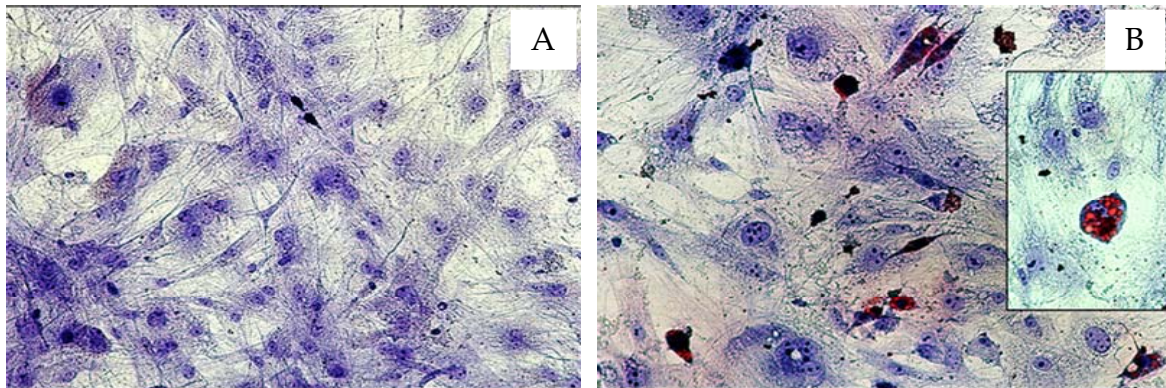
### 4.1 Caracterização *in vitro* das ADSC: potencial de diferenciação

As CTM estão distribuídas por todo o organismo, tendo em cada órgão vascularizado precursores que, quando submetidos a diferentes estímulos, podem se diferenciar para outros tipos celulares [137]. Aqui, o tecido escolhido para o isolamento das CTM foi à gordura por ser de fácil obtenção e por gerar um maior rendimento de células após o cultivo. Assim, camundongos da linhagem CBA/J foram utilizados para retirada do tecido adiposo da região abdominal e subsequente obtenção das ADSC. Depois de obtidas, as células foram cultivadas conforme descrito na seção de Material e Métodos até o momento do uso. Na 5ª passagem, as células permaneciam aderidas ao plástico com morfologia característica fibroblastóide, avaliadas em microscópio óptico (Figura 1). Após esta etapa, foi induzida a diferenciação para adipócitos, osteócitos e condrócitos.



**Figura 1:** ADSC de camundongos isoladas do abdômen de camundongos CBA/J. As células foram retiradas do tecido adiposo abdominal após digestão com colagenase II foram colocadas em cultura e na quinta passagem foram observadas em microscópio óptico, onde é possível observar células com morfologia de células-tronco mesenquimais. Aumento 40 X.

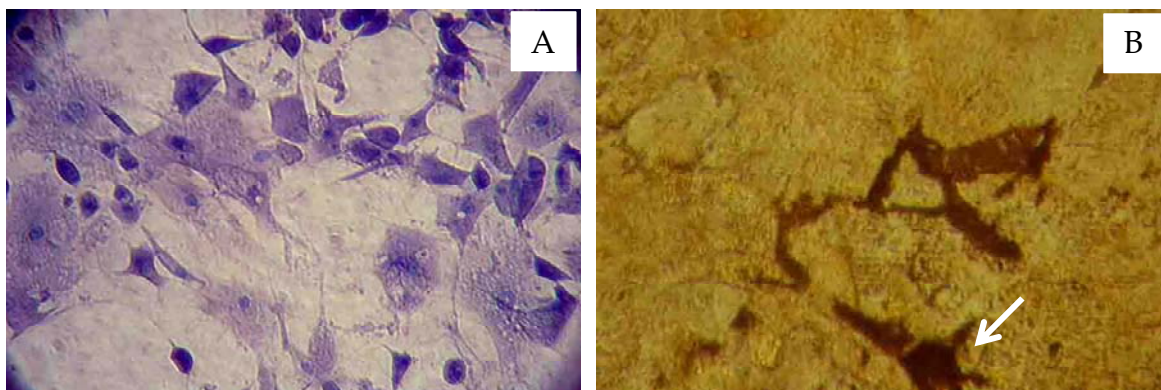
Na figura 2B, podemos observar a diferenciação das ADSC para adipócitos. Especificamente, visualizamos vesículas de gordura (coradas em laranja) no interior das células, por meio do corante *Oil-Red*, após 14 dias de diferenciação, o que não foi observado nas células controle que não receberam o estímulo (Figura 2A).



**Figura 2: ADSC de camundongos CBA/J diferenciadas para Adipócitos.** Em A, ADSC controle mantidas em cultura por 14 dias, não incubadas com meio de diferenciação para adipócito, coradas com hematoxilina. Em B, ADSC diferenciadas para adipócitos e, em laranja, vesículas adiposas coradas com Oil Red e contracoradas com Hematoxilina. Essas células foram submetidas a meio de cultura suplementado com insulina, dexametasona, IBMX e indometacina, e mantidas em cultura por 14 dias. Aumento de 200x.

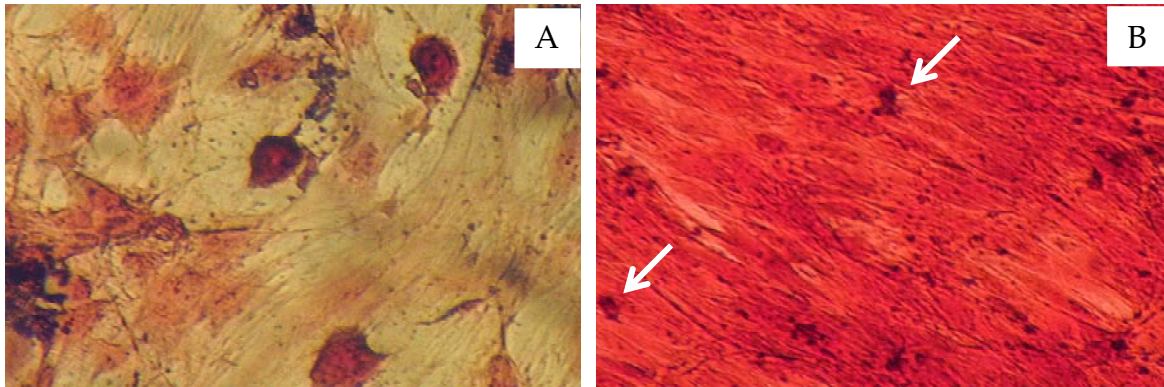


Na diferenciação para osteócitos, observamos a presença de colônias celulares com tonalidade marrom, após coloração pela prata (Von Kossa), evidenciando a presença da fosfatase alcalina, 21 dias após o início da diferenciação (Figura 3B). As células não diferenciadas não apresentaram esta coloração (Figura 3A).



**Figura 3: ADSC de camundongos CBA/J diferenciadas para Osteócitos.** Em A, ADSC controle, não incubadas com o meio de diferenciação para osteócito e mantidas em cultura por 28 dias, coradas com Hematoxilina. Em B, ADSC diferenciada para osteócito, seta em branco, demonstrando a presença de células contendo cálcio. Essas ADSC foram mantidas em cultura por 28 dias, incubadas em meio contendo dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato. Elas foram coradas pela técnica de Von Kossa, demonstrando depósitos de cálcio em marrom (seta branca), e contracorados com Hematoxilina. Aumento de 200x.

Finalmente, foi induzida a diferenciação para condrócitos e observamos feixes característicos de tecido cartilaginoso. Essas fibras foram evidenciadas pela coloração com Safranina O (Figura 4B), não sendo observadas nos controles (Figura 4A).



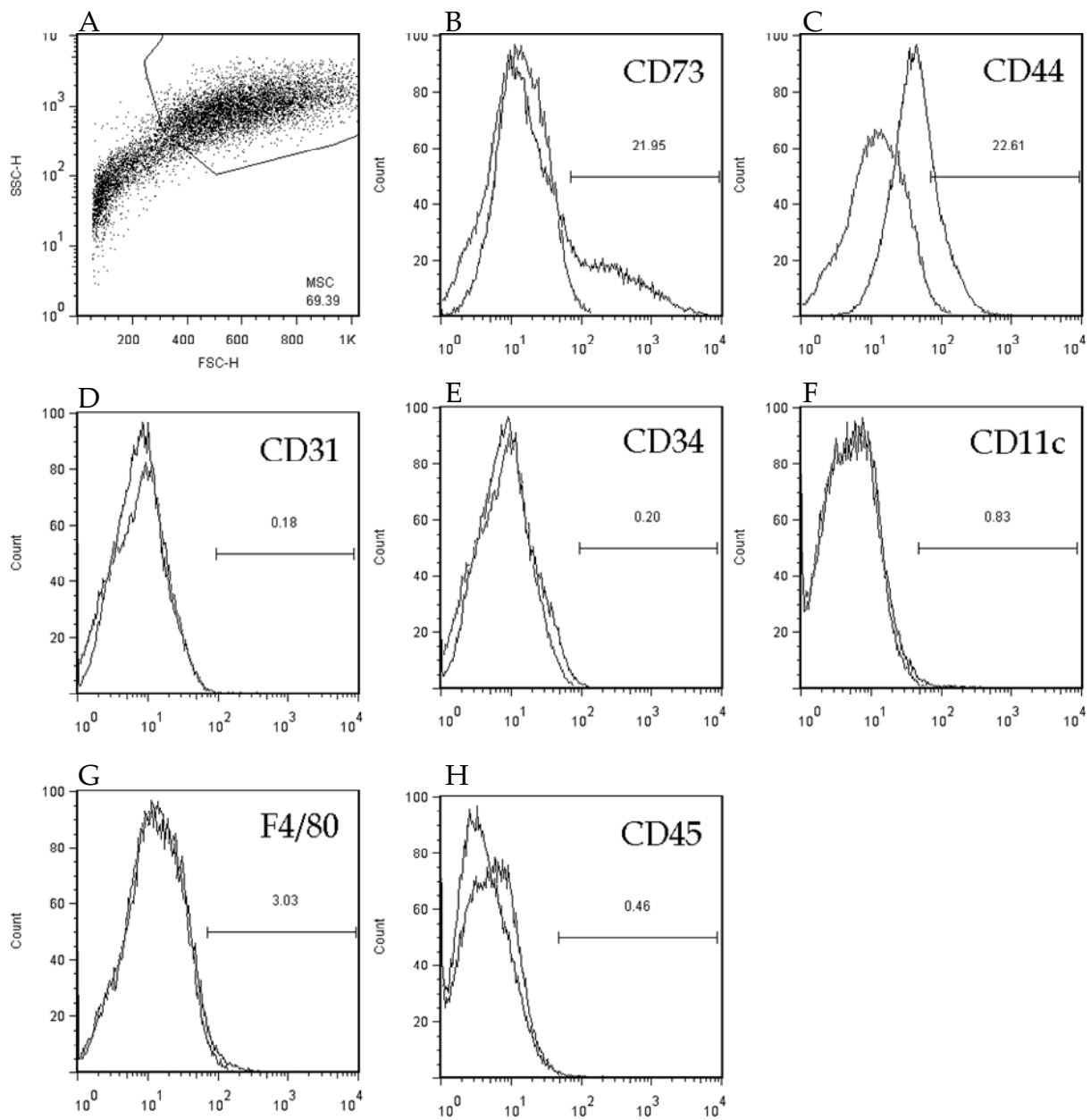
**Figura 4: ADSC de camundongos CBA/J diferenciadas para Condrócitos.** Em A, ADSC controle, não incubadas com o meio de diferenciação para condrócitos, e mantidas em cultura por 28 dias. Em B, ADSC diferenciadas para condrócitos. Essas ADSC foram mantidas em cultura por 28 dias, incubadas em meio contendo insulina, TGF- $\beta$  e ácido ascórbico. Elas foram coradas com Safranina O, demonstrando a formação de feixes e o grande depósito de glicosaminoglicanos corados em vermelho, e condroblastos (seta branca). Aumento de 200x.

## 4.2 Caracterização *in vitro* das ADSC: fenótipo celular

Após a diferenciação, caracterizamos fenotipicamente as ADSC. Assim, usamos células na 2ª e na 5ª passagem. Para tanto, utilizamos um painel de marcadores que abrangem os critérios mínimos exigidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular, sendo essas células positivas para CD73, CD90 e CD105 e negativas para CD34, CD45, CD11b, CD19 e HLA-DR [138].

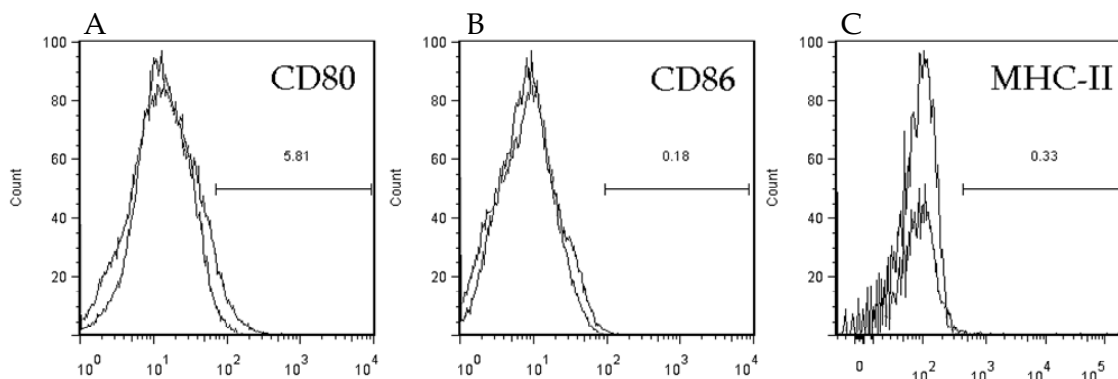
Aqui, na 5ª passagem, nós utilizamos para caracterizar as ADSC o CD73 e o CD44, comumente utilizado na caracterização de ADSC de camundongos, e como controle negativo as marcações para as moléculas CD11c, CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, F4/80 e MHC de classe II.

Ilustramos na figura 5 os resultados obtidos com os marcadores citados acima, assim como os controles isotípicos. As ADSC foram positivas para CD73 (21,95%) e CD44 (22,61%) (painel B e C). Destacamos também que não observamos a presença de contaminantes celulares como células-tronco hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>), células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>), células da linhagem linfóide (CD45<sup>+</sup>), macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), e células endoteliais (CD31<sup>+</sup>) (painel D, E, F, G, H).



**Figura 5: Caracterização fenotípica das ADSC.** As células na 5<sup>a</sup> passagem foram analisadas por citometria de fluxo para os marcadores de superfície: CD11c, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73. Em tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), procuramos uma população celular grande e com grande complexidade intracelular. Em A, observamos o “gate” de células selecionadas para análise (P1). Em cada ensaio foram obtidas 50 mil eventos de (P1). De (B) a (H), temos a análise das células em histograma, analisados para intensidade fluorescência, (deslocamento para direita). A linha cinza compreende as ADSC marcadas com controle isotópico e a linha preta as ADSC marcadas com os anticorpos monoclonais de interesse. Os valores estão em forma de porcentagem mostrados em forma de *gate* (traço) comparando o que é expresso ao controle. As amostras foram obtidas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BDBioscience). Os dados foram analisados no programa FlowJO.

Adicionalmente na figura 6, as ADSC apresentavam uma baixa expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e MHC-II (painel A, B, C).



**Figura 6: Avaliação de moléculas co-estimulatórias nas ADSC.** As células na 5ª passagem foram analisadas pro citometria de fluxo para os marcadores de superfície: CD80, CD86 e MHC-II. As células selecionadas foram às mesmas acima citadas. De (A) a (C), temos a análise das células em histograma, analisados para intensidade fluorescência, (deslocamento para direita). A linha cinza compreende as ADSC marcadas com controle isotípico e a linha preta as ADSC marcadas com os anticorpos monoclonais de interesse. controle isotípico. Os valores estão em forma de porcentagem mostrados em forma de *gate* (traço) comparando o que é expresso ao controle. As amostras foram obtidas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BDBioscience). Os dados foram analisados no programa FlowJO.

A tabela 2 ilustra um comparativo das marcações obtidas com as células na 2ª e na 5ª passagem, evidenciando que após algumas passagens obtivemos uma população mais pura de ADSC.

**Tabela 2: Porcentagem de expressão dos marcadores de superfície na 2ª e 5ª passagem.**

Marcador	P2	P5
CD31 – FITC	0,36%	0,18%
CD34 – FITC	0,47%	0,20%
CD44 – PE	34,09%	22,61%
CD45 – PerCP	1,74%	0,46%
CD73 – PE	9,19%	21,95%
CD11c – PE-Cy5	0,39%	0,83%
CD80 – FITC	10,58%	5,81%
CD86 – PE	0,45%	0,18%

### 4.3 Análise da sobrevida do enxerto de pele após tratamento com diferentes populações celulares

Após obtenção e caracterização das ADSC, iniciamos os experimentos *in vivo* no intuito de evidenciar um papel supressor numa resposta aloígena a um enxerto. Em 2006, o grupo da Katarina Le Blanc demonstrou a capacidade de CTM inibir a doença do enxerto contra o hospedeiro em pacientes transplantados de medula óssea [139]. A figura 7 ilustra o nosso protocolo experimental.

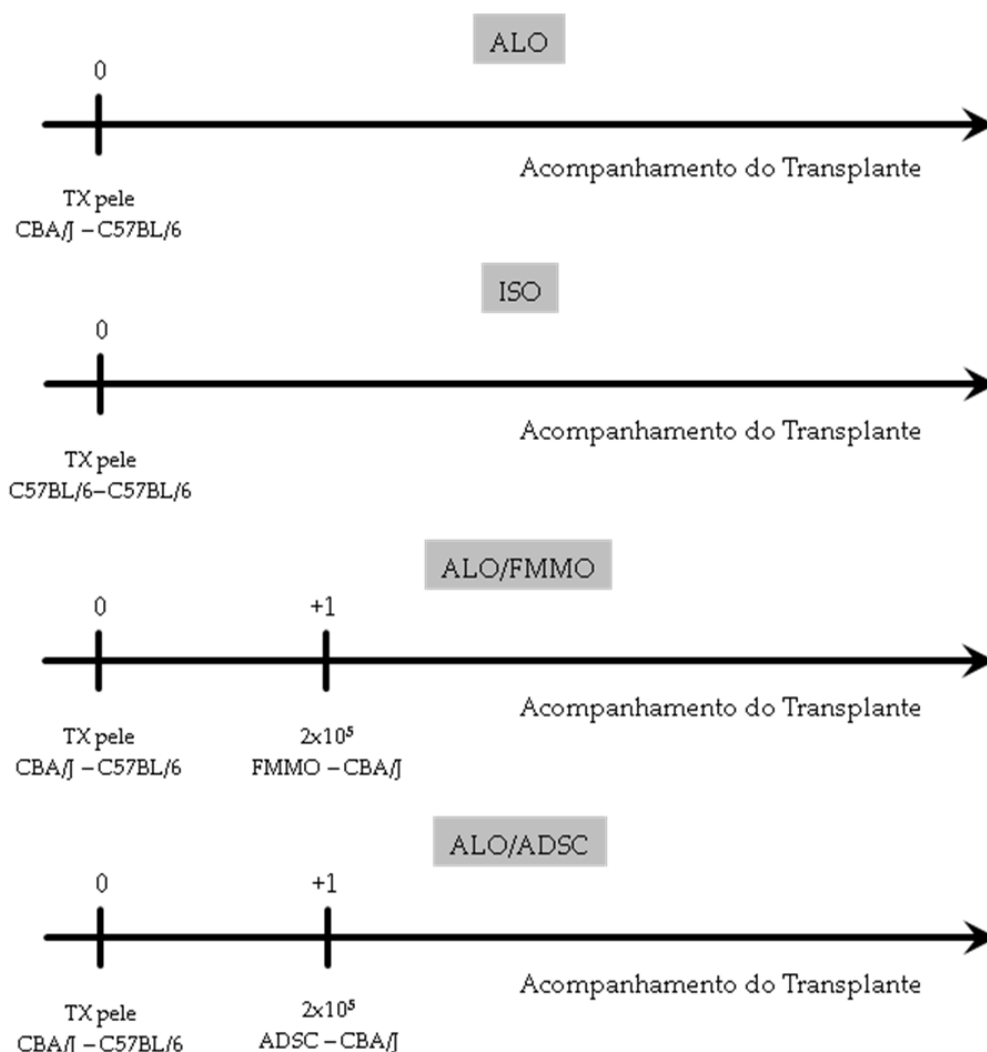
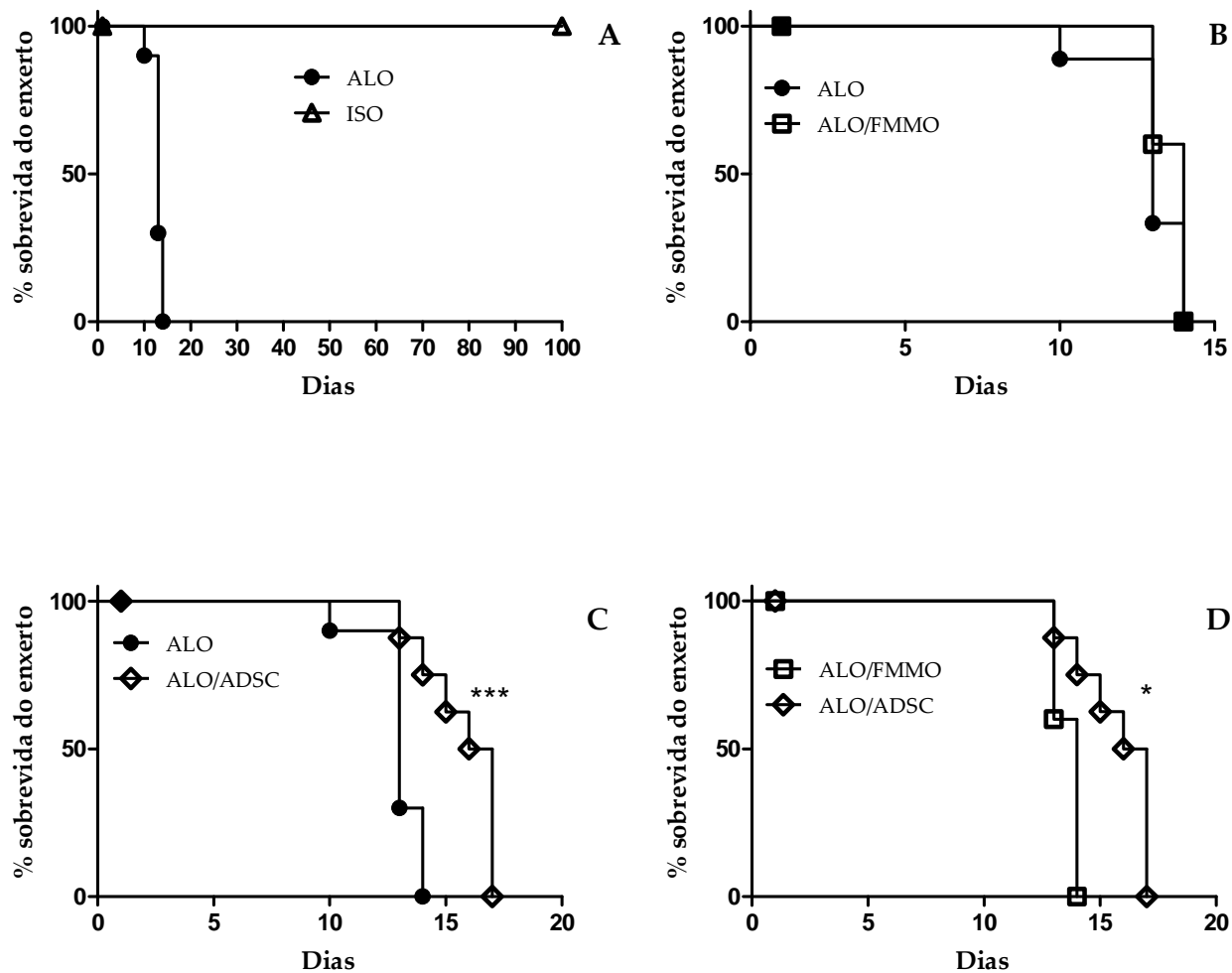


Figura 7: Protocolo experimental utilizado para realização dos transplantes e inoculação ou não com as ADSC.

Nos transplantes isogênicos ISO, observamos o aceite do tecido transplantado por 100 dias (Figura 8A). Realizamos o transplante da pele da cauda de um doador alogênico (CBA/J H-2<sup>k</sup>) em animais C57BL/6 receptores (H-2<sup>d</sup>). Os animais que não receberam nenhum tratamento, grupo ALO, apresentaram uma média de sobrevida do enxerto de 13 dias (Figura 8, painéis A, B e C) (linha preenchida).

Posteriormente, investigamos se a fração mononuclear da medula óssea (FMMO) de animais CBA/J poderia aumentar significativamente a sobrevida do enxerto proveniente do mesmo doador (Grupo ALO/FMMO). Neste grupo, um dia após o transplante, os animais receptores receberam  $2 \times 10^5$  células da FMMO por via intraperitoneal, porém não foi observado aumento significativo na sobrevida do enxerto comparado ao grupo não tratado (média de sobrevida de 14 dias) (Figura 8B).

Subseqüente, a esses resultados, realizamos os experimentos com as ADSC de animais CBA/J, como caracterizadas anteriormente. Os animais transplantados com pele alogênica receberam no dia +1,  $2 \times 10^5$  células por via intraperitoneal, e foram acompanhados diariamente. Esse grupo apresentou uma média de sobrevida de 16 dias e meio, apresentando significância estatística quando comparado ao grupo ALO ( $p < 0,001$ ) (Figura 8C) e também quando comparado ao grupo FMMO ( $p = 0,01$ ) (Figura 8D).



**Figura 8: Sobrevida do enxerto de pele isogênico e alogênico com ou sem administração de células.** Camundongos C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) foram transplantados com a pele da cauda do doador alogênico CBA/J (H2<sup>k</sup>), e monitorados diariamente até o momento da rejeição que foi considerada quando 90% do enxerto apresentava um aspecto necrosado. A figura A ilustra os grupos controles do nosso estudo, onde camundongos C57BL/6 foram transplantados com a pele do doador alogênico (●) ou singênico (Δ). A figura B mostra grupo alogênico comparado ao grupo que recebeu 2x10<sup>5</sup> da fração mononuclear da medula óssea via peritoneal (dia +1), grupo ALO/FMMO (◻). A figura C ilustra o grupo alogênico comparado ao grupo ALO/ADSC (◊) que recebeu via intraperitoneal 2x10<sup>5</sup> de ADSC (dia +1) "Log-rank (Mantel-Cox) Test". \*\*\* p < 0,001, \* p < 0,05.



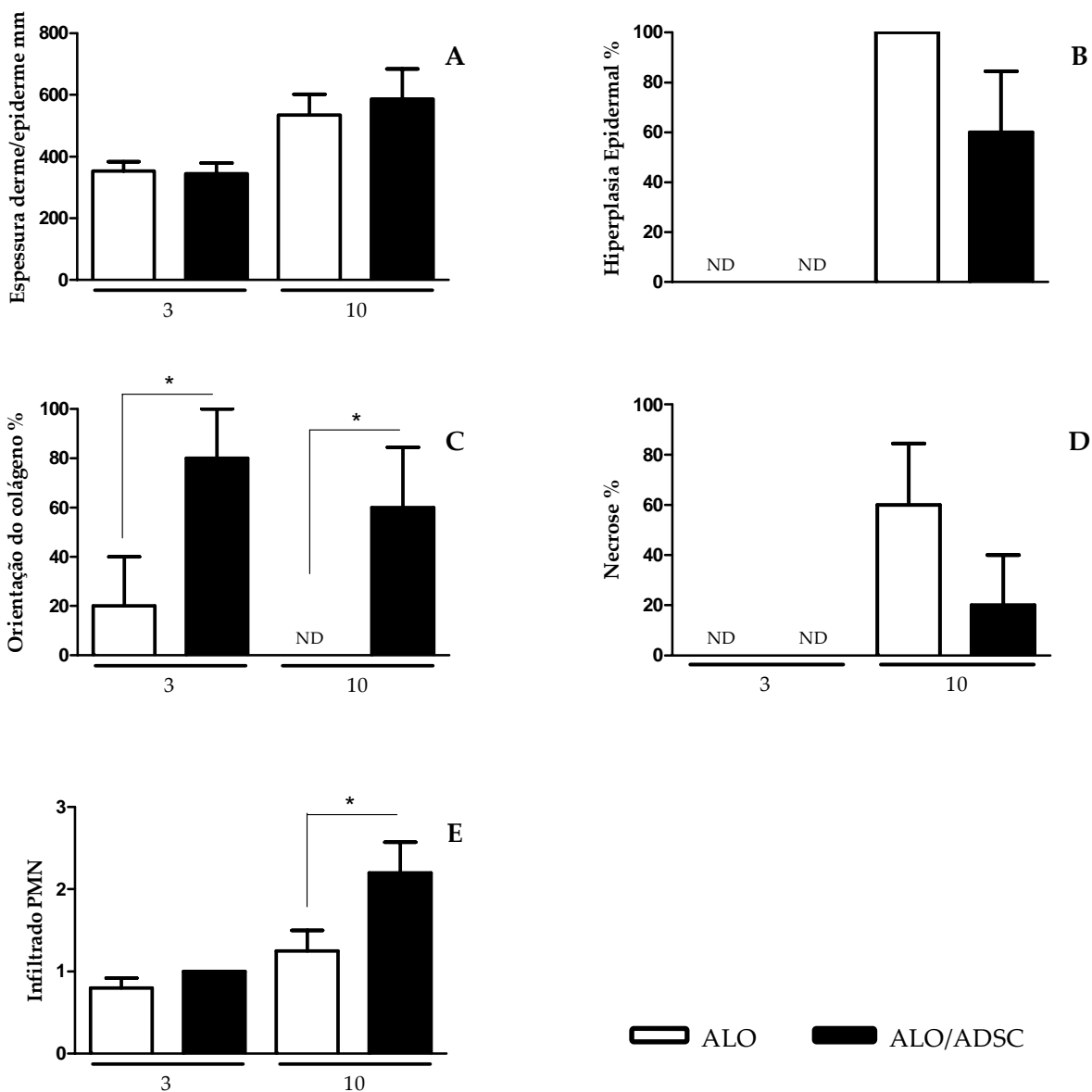
#### **4.4 Estudo histológico do enxerto após o transplante alogênico nos animais tratados ou não com ADSC**

Como vimos um aumento na sobrevida do enxerto, investigamos os aspectos morfológicos do enxerto, relacionados a esse aumento da sobrevida nos tempos de 3 dias e 10 dias, nos grupos ALO e ALO/ADSC.

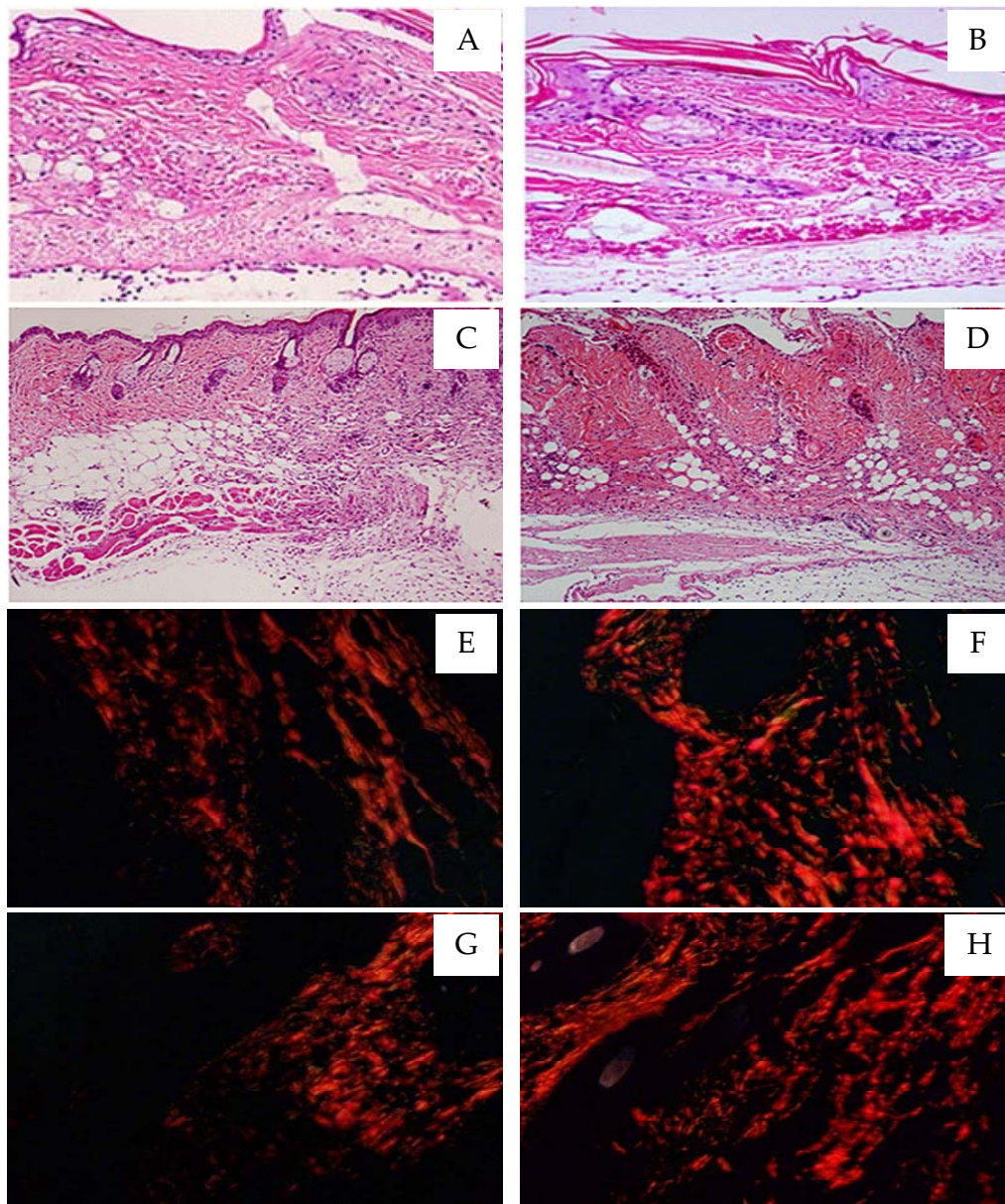
A figura 9 ilustra análise morfométrica do enxerto 3 e 10 dias após o transplante. Não observamos uma diferença quanto à espessura da derme e da epiderme entre os grupos de estudo. Quantificamos, porém um discreto infiltrado de neutrófilos no grupo tratado com ADSC no 3º dia (Figura 9, painéis A e E). No 10º dia após o transplante, este infiltrado aumentou e obtivemos uma diferença estatisticamente significativa (Figura 9 E) ( $p = 0,03$ ).

Um dado importante evidenciado foi à distribuição da deposição de colágeno, identificada por coloração de Picrosirius, mostrando que os animais tratados com as ADSC tiveram uma melhor orientação do colágeno, corado em vermelho (Figura 10, painéis E, F, G e H), tanto em 3 quanto em 10 dias ( $p = 0,03$ ) (Figura 9C), e que esse colágeno estava apresentado de forma mais organizada. Conjuntamente, os animais tratados com as ADSC apresentaram uma menor hiperplasia (Figura 9B) e também uma menor área necrótica (Figura 9D), embora sem diferença estatística.

A figura 10 A, B, C e D ilustram os cortes nos tempos de 3 e 10 dias corados com hematoxilina-eosina. Deste modo podemos dizer que as ADSC aumentam a sobrevida do enxerto e que esse aumento estava vinculado a um melhor aspecto morfológico do tecido.



**Figura 9: Análises histopatológicas do enxerto 3 e 10 dias pós-transplante.** Os camundongos foram transplantados e nos dias 3 e 10 pós-transplante tiveram o enxerto retirado para análise dos cortes histológicos. Estão representados quatro grupos de estudo: *tempo 3 dias* - tratados com células ADSC (barra preta) n=5 e não tratados (barra branca) n=5 e *tempo 10 dias* - tratados com células ADSC (barra preta) n=10 e não tratados (barra branca) n=10. A figura (A) representa espessura da derme e epiderme, (B) presença de hiperplasia, (C) orientação de colágeno, (D) tecido necrosado e (E) infiltrado de neutrófilos. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão; "Mann Whitney test" \* p < 0,05.



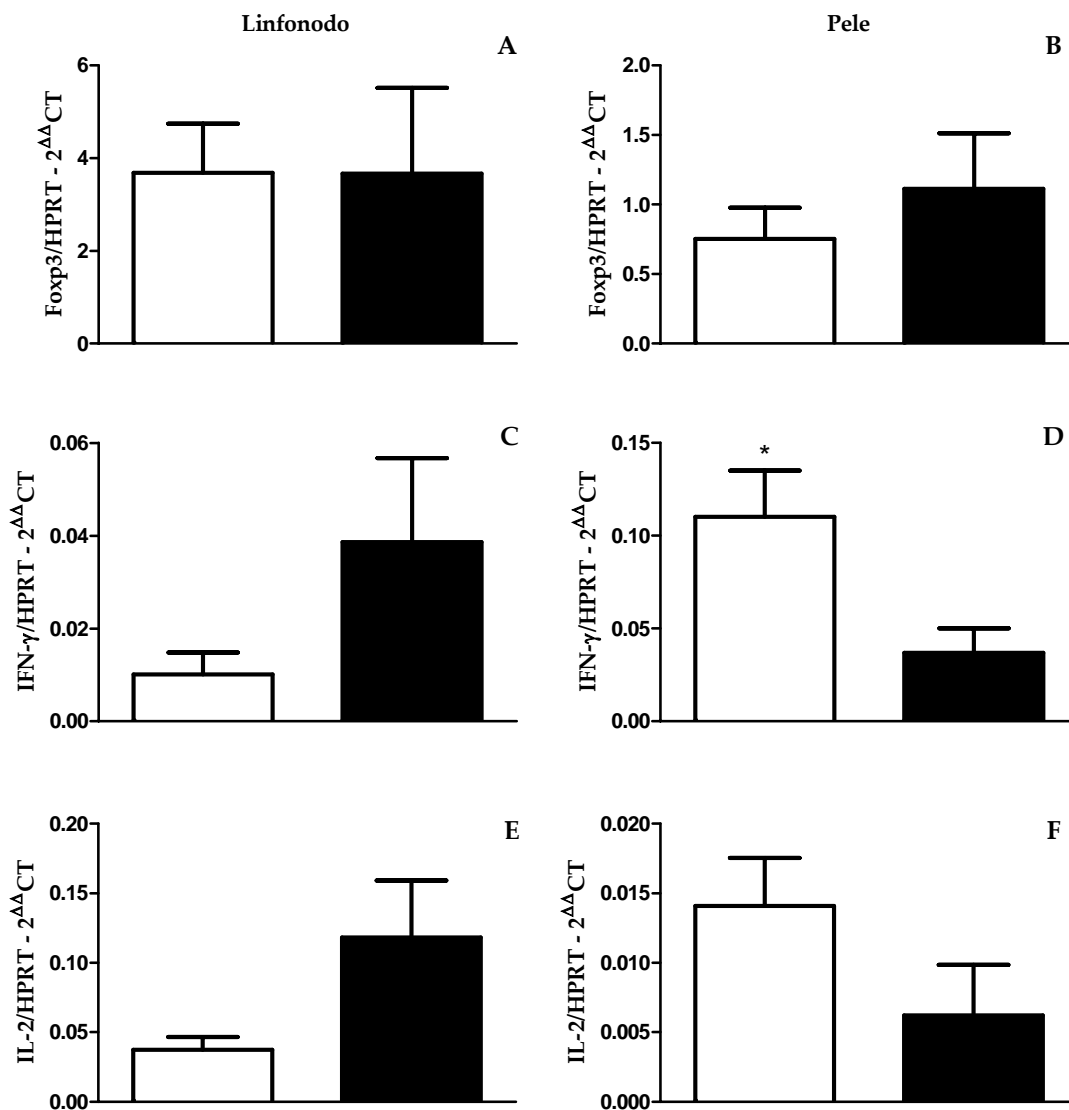
**Figura 10: Avaliação dos cortes histológicos do enxerto após o transplante alôgênico.** Os animais C57BL/6 foram transplantados com a pele do doador alôgênico CBA/J, e nos tempos de 3 e 10 dias observamos os cortes histológicos. As figuras (A) ilustra o corte do grupo alôgênico não tratado 3 dias 100x, (B) grupo tratado com as ADSC 3 dias 100x, (C) não tratado 10 dias 100x, (D) tratado com as ADSC 10 dias 100x coradas com HE. A figura (E) ilustra enxertos de camundongos não tratados 3 dias 400x, (F) tratados com ADSC 3 dias 400x, (G) não tratados 10 dias 400x, e (H) tratados com ADSC 10 dias 400x corados com Picrosírius. Para análise de HE foi utilizado microscópio óptico comum, e para análise do Picrosírius utilizamos microscopia de luz polarizada evidenciando a orientação do colágeno em vermelho. Para as análises utilizamos microscópio acoplado a computadores com sistema interativo *Leica Q-win V3*.

#### **4.5 Caracterização do perfil de citocinas e de moléculas relacionadas ao fenótipo de células T reguladoras presentes na pele e nos linfonodos drenantes no dia da rejeição**

Neste primeiro painel de experimentos, avaliamos, tanto no enxerto quanto nos linfonodos drenantes, as citocinas produzidas e as moléculas relacionadas ao fenótipo de células T reguladoras. Usando a metodologia de PCR em tempo real, analisamos a expressão de mRNA de IL-2, IFN- $\gamma$  e Foxp3. A expressão gênica foi normalizada com o controle endógeno *HPRT*. A expressão relativa foi calculada em relação àquela do grupo não tratado (Grupo ALO), conforme descrita no Material e Métodos.

Ao analisarmos a expressão nos linfonodos, não observamos diferença na amplificação dos genes de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Figura 11, painéis C e E). Também não notamos diferença na expressão de Foxp3 (Figura 11 A).

Quando estudamos a expressão desses mRNA no enxerto, observamos uma inversão no padrão de expressão das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , conforme descrito anteriormente para os linfonodos drenantes, embora a expressão da citocina IL-2 não apresentasse diferença estatística entre os grupos (Figura 11F). Em relação ao IFN- $\gamma$ , observamos uma supressão desta citocina no grupo tratado com as ADSC, estatisticamente significativa ( $p = 0,01$ ), em relação ao grupo não tratado (Figura 11D). A expressão da molécula Foxp3 no enxerto foi similar entre grupos experimentais (Figura 11B).

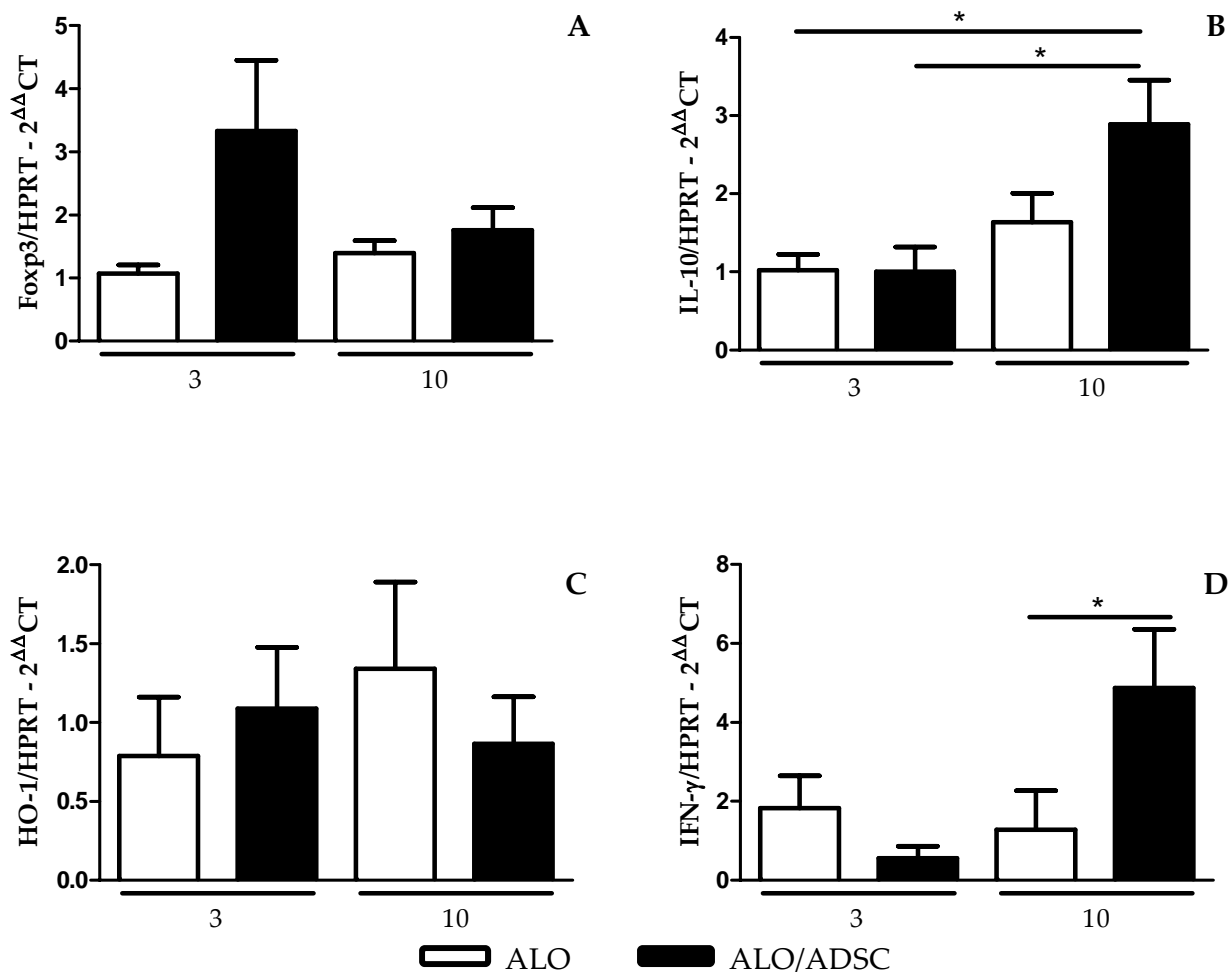


**Figura 11: Expressão gênica relativa de Foxp3, IFN- $\gamma$  e IL-2 no dia da rejeição por q-PCR.** Camundongos C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) foram transplantados com a pele da cauda do doador alôgênico CBA/J (H2<sup>k</sup>) e tratados com ADSC (ALO/ADSC) ou não (ALO). Para tanto foram analisadas as moléculas: Foxp3 (A), IL-2 (C) e IFN- $\gamma$  (E) nos linfonodos drenantes e Foxp3 (B), IL-2 (D) e IFN- $\gamma$  (F) no enxerto de pele no dia em que os animais rejeitaram o enxerto. Estão representados dois grupos de estudo: tratados com células ADSC (barra preta) n = 10 e não tratados (barra branca) n = 10. A expressão relativa foi calculada em relação à média global do grupo não tratado. A expressão foi normalizada pelos níveis de expressão de HPRT mRNA e calculado pela fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão; "Mann Whitney test" \* p < 0,05.

#### **4.6 Análise da expressão de citocinas e de moléculas relacionadas a regulação da resposta imune nos linfonodos drenantes, 3 e 10 dias após o transplante.**

Após avaliarmos as citocinas e moléculas relacionadas à regulação da resposta imune no dia da rejeição, decidimos estudar sua cinética, enfatizando um momento precoce, correspondendo ao estabelecimento da resposta imune adquirida, e um momento mais tardio, onde a rejeição do enxerto já pode ser visualizada (considerado por nós como uma fase efetora).

Neste primeiro painel de experimentos, nos linfonodos drenantes, avaliamos as citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , o fator de transcrição Foxp3 e a molécula HO-1. A expressão de Foxp3 não apresentou diferença entre os grupos, tanto 3 dias quanto em 10 dias após o transplante (Figura 12A). O mesmo perfil foi observado para a molécula HO-1, já a IL-10 se apresentou mais expressa nos animais tratados ( $p = 0,008$ ) (Figura 12, painéis B e C). Como observado no dia da rejeição, os animais do grupo tratado com as ADSC apresentaram uma maior expressão, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), nos níveis de mRNA para a citocina IFN- $\gamma$ , no dia 10 após a cirurgia (Figura 12D).



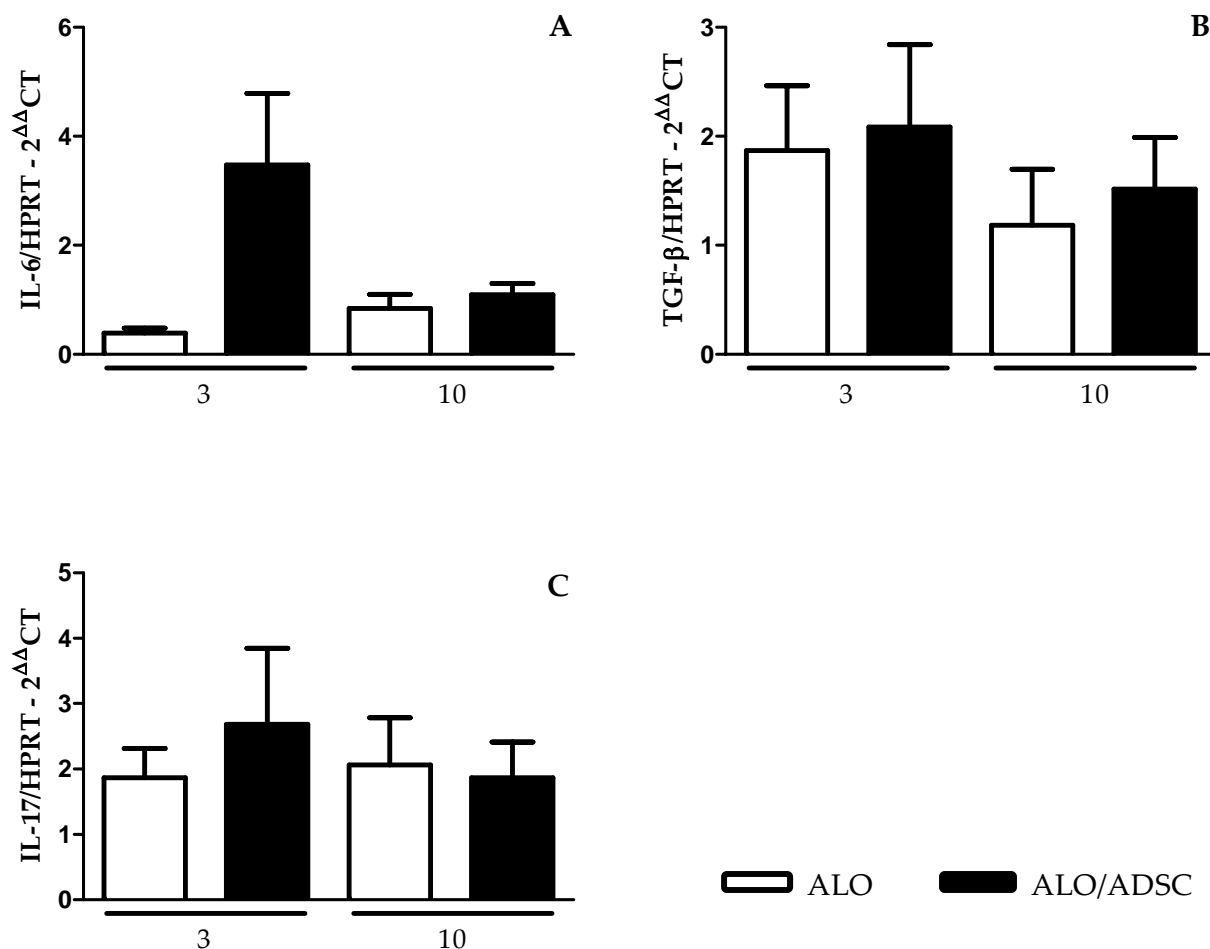
**Figura 12: Estudo cinético da expressão gênica relativa de Foxp3, IL-10, HO-1 e IFN- $\gamma$  nos linfonodos drenantes.** Camundongos C57BL/6 ( $H2^b$ ) foram transplantados com a pele da cauda do doador alogênico CBA/J ( $H2^k$ ) e tratados com ADSC (ALO/ADSC) ou não (ALO) e nos dias 3 e 10 pós-transplante tiveram linfonodos drenantes retirados para análise. Estão representados quatro grupos de estudo: *tempo 3 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$  e *tempo 10 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$ . A expressão relativa foi calculada em relação à média global do grupo não tratado, Foxp3 (A), IL-10 (B), HO-1 (C) e IFN- $\gamma$  (D). A expressão foi normalizada pelos níveis de expressão de HPRT mRNA e calculado pela fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão; "Mann Whitney test" \*  $p < 0,05$ ; "Kruskal-Wallis test" \*\*  $p < 0,005$ .

#### **4.7 Análise das citocinas relacionadas à diferenciação de células Th17 nos linfonodos drenantes.**

Conforme descrito anteriormente, as células Th17 foram descritas como uma nova população de células T capazes de secretar grandes quantidades de IL-17, dependente do estímulo de TGF- $\beta$  e IL-6, em modelos murinos [140]. Recentemente, foi revisto o papel das citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$  na rejeição a transplantes [141].

Portanto, quantificamos estas citocinas (mRNA) após o transplante. Três dias após a cirurgia, não foi observado diferença na expressão gênica das citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  quando comparados os dois grupos (Figura 13 A e B). No 10º dia pós-transplante, também não notamos nenhuma diferença na expressão dessas duas citocinas (Figura 13, painéis A e B). Este mesmo padrão foi observado para a citocina IL-17, tanto no tempo de 3 dias e 10 dias (Figura 13 C).

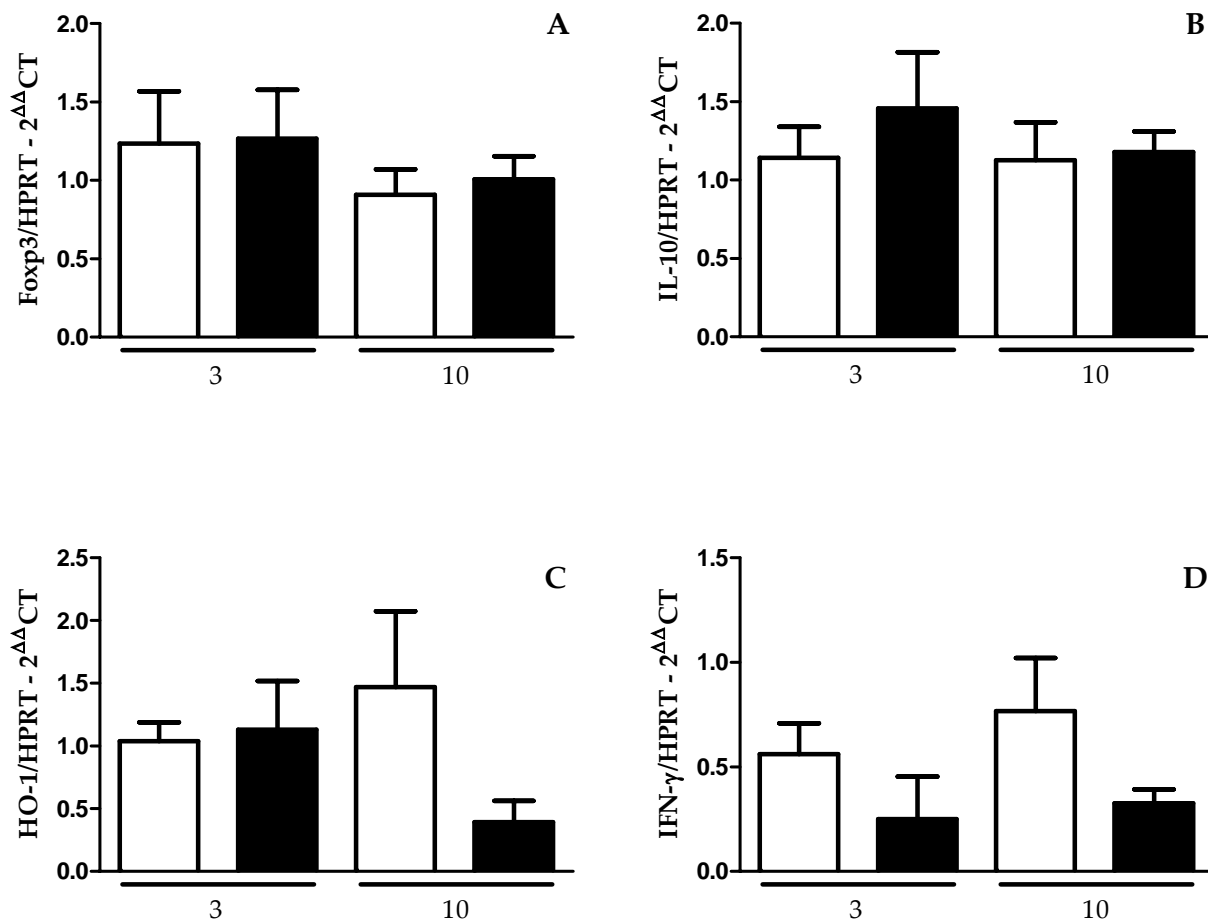




**Figura 13: Estudo cinético da expressão gênica relativa de IL-6, TGF-β e IL-17 nos linfonodos drenantes.** Camundongos C57BL/6 ( $H2^b$ ) foram transplantados com a pele da cauda do doador alogênico CBA/J ( $H2^k$ ) e tratados com ADSC (ALO/ADSC) ou não (ALO) e nos dias 3 e 10 pós-transplante tiveram linfonodos drenantes retirados para análise. Estão representados quatro grupos de estudo: *tempo 3 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$  e *tempo 10 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$ . A expressão relativa foi calculada em relação à média global do grupo não tratado, IL-6 (A), TGF-β (B) e IL-17 (C). A expressão foi normalizada pelos níveis de expressão de HPRT mRNA e calculado pela fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.8 Análise da expressão de citocinas e moléculas relacionadas a regulação da resposta imune no enxerto, 3 e 10 dias após o transplante**

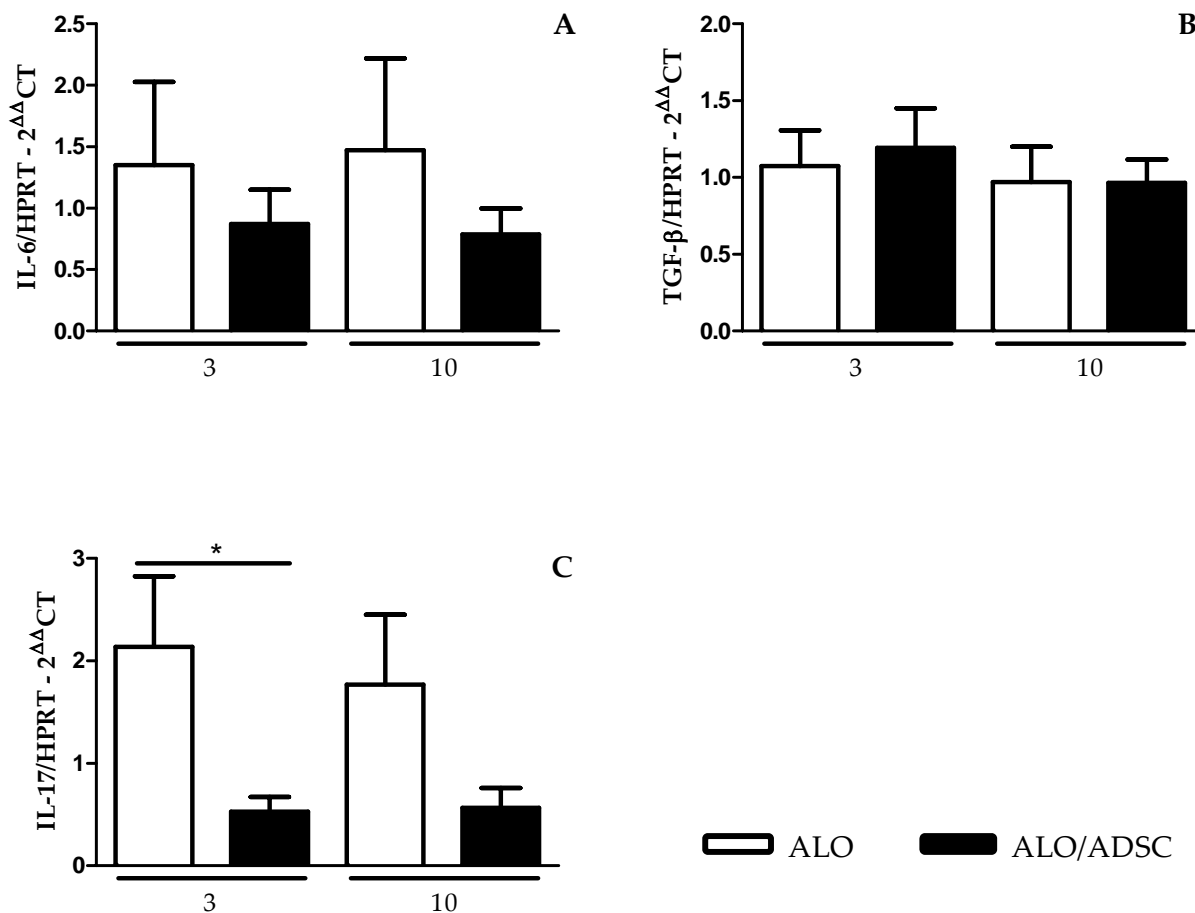
Os mesmos genes estudados anteriormente nos linfonodos drenantes foram quantificados no enxerto nos tempos de 3 e 10 dias após o transplante. Em relação ao Foxp3 (Figura 14A), não observamos diferença entre os grupos em nenhum dos pontos estudados. O mesmo perfil foi observado em relação à HO-1 e a citocina IL-10 (Figura 14 B e C). Embora no linfonodo tivéssemos observado uma diferença no 10<sup>o</sup> dia na produção de IFN- $\gamma$ , no enxerto não constatamos diferença em nenhum ponto estudado (Figura 14D).



**Figura 14:** Estudo cinético da expressão gênica relativa de Foxp3, IL-10, HO-1 e IFN- $\gamma$  no enxerto. Camundongos C57BL/6 ( $H2^b$ ) foram transplantados com a pele da cauda do doador alogênico CBA/J ( $H2^k$ ) e tratados com ADSC (ALO/ADSC) ou não (ALO) e nos dias 3 e 10 pós-transplante tiveram o enxerto de pele retirado para análise. Estão representados quatro grupos de estudo: *tempo 3 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$  e *tempo 10 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$ . A expressão relativa foi calculada em relação a média global do grupo não tratado, Foxp3 (A), IL-10 (B), HO-1 (C) e IFN- $\gamma$  (D). A expressão foi normalizada pelos níveis de expressão de HPRT mRNA e calculado pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.9 Análise das citocinas relacionadas a diferenciação de células Th17 no enxerto**

Após analisarmos os linfonodos drenantes, decidimos estudar o padrão de moléculas relacionadas à polarização para o fenótipo Th17 também no local da resposta imune ao enxerto. Inicialmente, avaliarmos os níveis das citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  e não notamos diferenças nos animais do grupo tratado com as ADSC em relação ao grupo não tratado (Figuras 15, painéis A e B). Ao analisarmos os níveis da citocina IL-17, notamos que esta citocina estava muito menos expressa nos animais do grupo tratado com as ADSC no 3º dia, apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ), o que não foi observado no 10º dia (Figura 15C). Esses dados nos levam a crer que haja uma supressão precoce da resposta imune alogênica pelas ADSC no local da lesão, o que não foi evidenciado nos linfonodos.

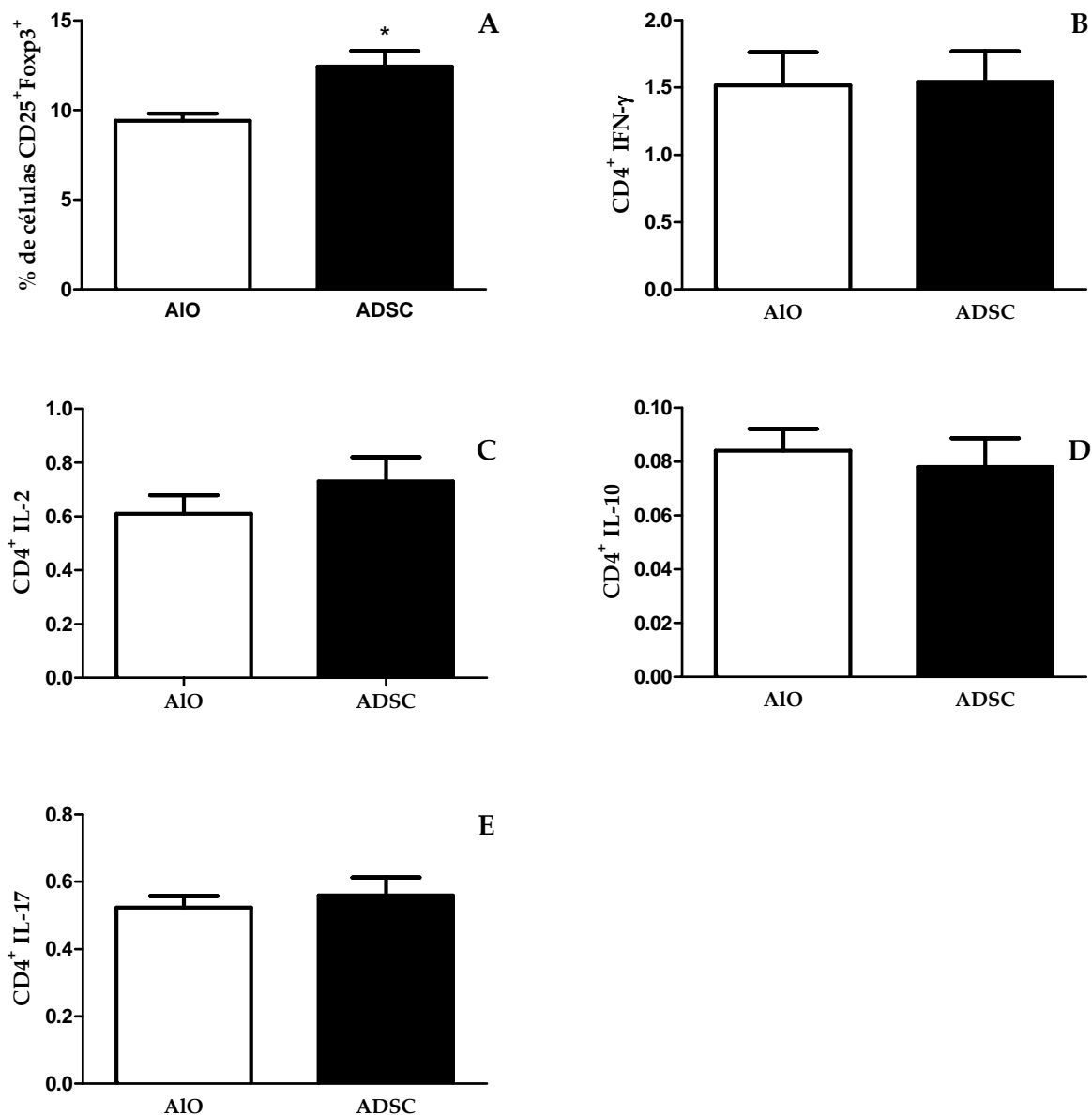


**Figura 15: Estudo cinético da expressão gênica relativa de IL-6, TGF- $\beta$  e IL-17 no enxerto.** Camundongos C57BL/6 ( $H2^b$ ) foram transplantados com a pele da cauda do doador alogênico CBA/J ( $H2^k$ ) e tratados com ADSC (ALO/ADSC) ou não (ALO) e nos dias 3 e 10 pós-transplante tiveram o enxerto de pele retirado para análise. Estão representados quatro grupos de estudo: *tempo 3 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$  e *tempo 10 dias* - tratados com células ADSC (barra preta)  $n = 10$  e não tratados (barra branca)  $n = 10$ . A expressão relativa foi calculada em relação à média global do grupo não tratado, IL-6 (A), TGF- $\beta$  (B) e IL-17 (C). A expressão foi normalizada pelos níveis de expressão de HPRT mRNA e calculado pela fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão; "Mann Whitney test" \*  $p < 0,05$ .

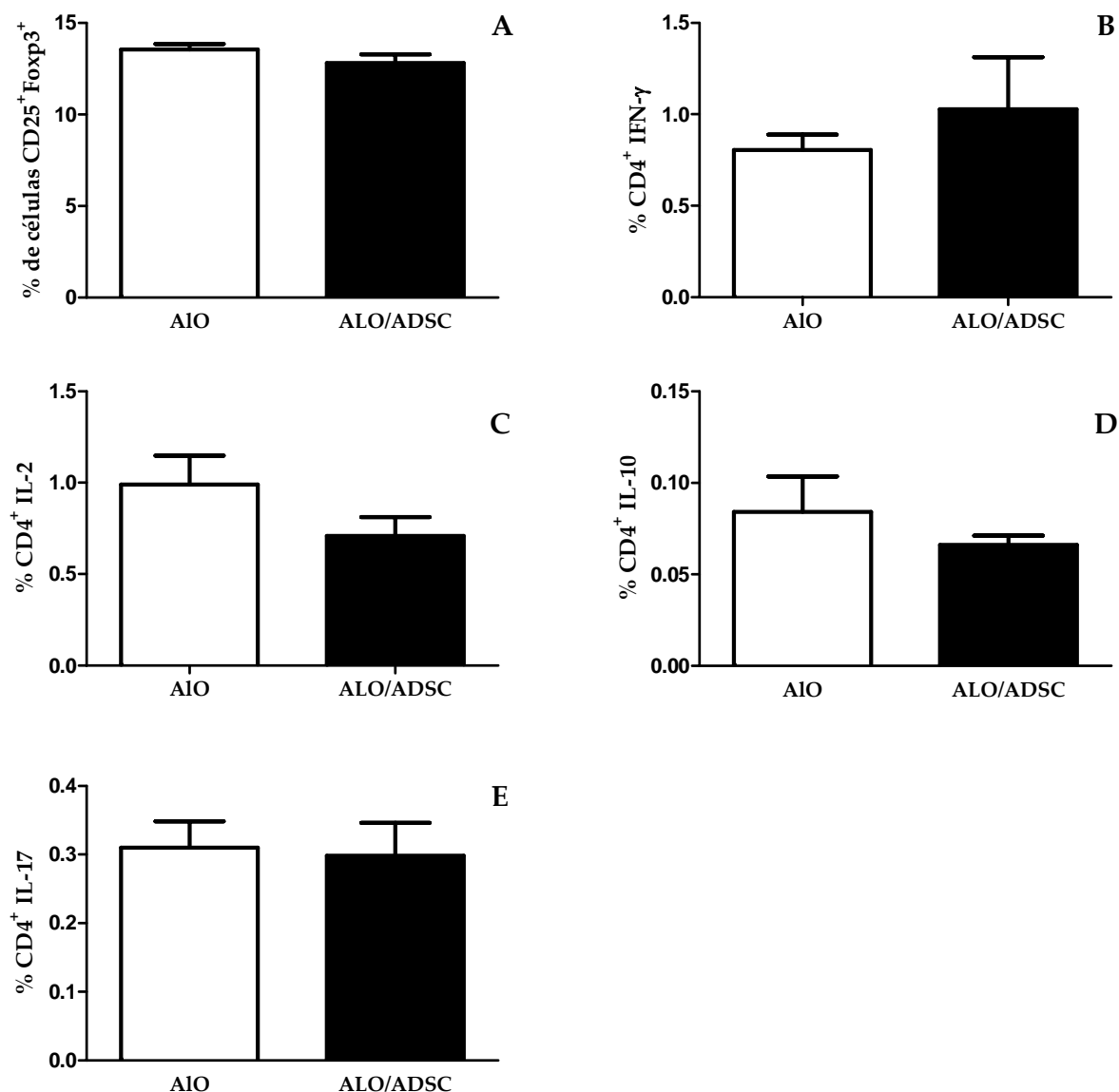
#### **4.10 Identificação das citocinas secretadas pelas células T CD4<sup>+</sup> presentes nos linfonodos drenantes e células T reguladoras por citometria de fluxo**

Para tentar confirmar os dados obtidos por PCR em tempo real nas análises dos linfonodos, avaliamos as citocinas produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup> presentes nos linfonodos drenantes por citometria de fluxo. Estudamos as citocinas IL-2, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e o fator de transcrição Foxp3. Confirmando os dados obtidos com o PCR em tempo real, não observamos nenhuma diferença na expressão de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  (Figura 16, painéis B, C, D e E). Para análise da molécula Foxp3 fizemos um “gate” inicial nas células CD4<sup>+</sup> e selecionamos as células CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, e observamos que elas estavam mais presentes nos animais tratados com as ADSC (Figura 16A).

O mesmo perfil de citocinas foi estudado após 10 dias de transplante. Neste período após o transplante, não observamos diferença na porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Figura 17A) e na expressão de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  (Figura 14B, C, D e E). Estes dados corroboram àqueles obtidos anteriormente por PCR em tempo real.



**Figura 16: Estudo das citocinas IL-2, IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  e da molécula Foxp3, 3 dias pós-transplantes nos linfonodos drenantes.** Os camundongos foram transplantados e no 3<sup>o</sup> dia as células dos linfonodos foram fenotipadas. Para análise das células T reguladoras, as células foram marcadas externamente com anticorpo monoclonal anti - CD4 (PerCP) e anti - CD25 (PE) e internamente com anticorpo monoclonal anti - Foxp3 (APC). As células reguladoras foram selecionadas inicialmente com um "gate" nas células T CD<sup>+</sup> e posteriormente analisadas quanto a expressão de CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (A). Para análise das citocinas as células foram incubadas por 6 horas com brefeldina, PMA e ionomicina, e marcadas com anti-CD4 (PerCP), permeabilizadas e marcadas com anticorpos anti - IFN- $\gamma$  (FITC) (B), anti - IL-2 (PE) (C), anti - IL-10 (APC) (D) e anti - IL-17 (PE) (E). As amostras foram obtidas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BDBioscience). Os dados foram analisados no programa FlowJO. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão; "Mann Whitney test" \* p < 0,05.



**Figura 17: Estudo das citocinas IL-2, IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  e da molécula Foxp3, 10 dias pós-transplantes nos linfonodos drenantes.** Os camundongos foram transplantados e no 10<sup>o</sup> dia as células dos linfonodos foram fenotipadas. Para análise das células T reguladoras, as células foram marcadas externamente com anticorpo monoclonal anti - CD4 (PerCP) e anti - CD25 (PE) e internamente com anticorpo monoclonal anti - Foxp3 (APC). As células reguladoras foram selecionadas inicialmente com um “gate” nas células T CD<sup>+</sup> e posteriormente analisadas quanto a expressão de CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (A). Para análise das citocinas as células foram incubadas por 6 horas com brefeldina, PMA e ionomicina, e marcadas com anti-CD4 (PerCP), permeabilizadas e marcadas com anticorpos anti - IFN- $\gamma$  (FITC) (B), anti - IL-2 (PE) (C), anti - IL-10 (APC) (D) e anti - IL-17 (PE) (E). As amostras foram obtidas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BDBioscience). Os dados foram analisados no programa FlowJO. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

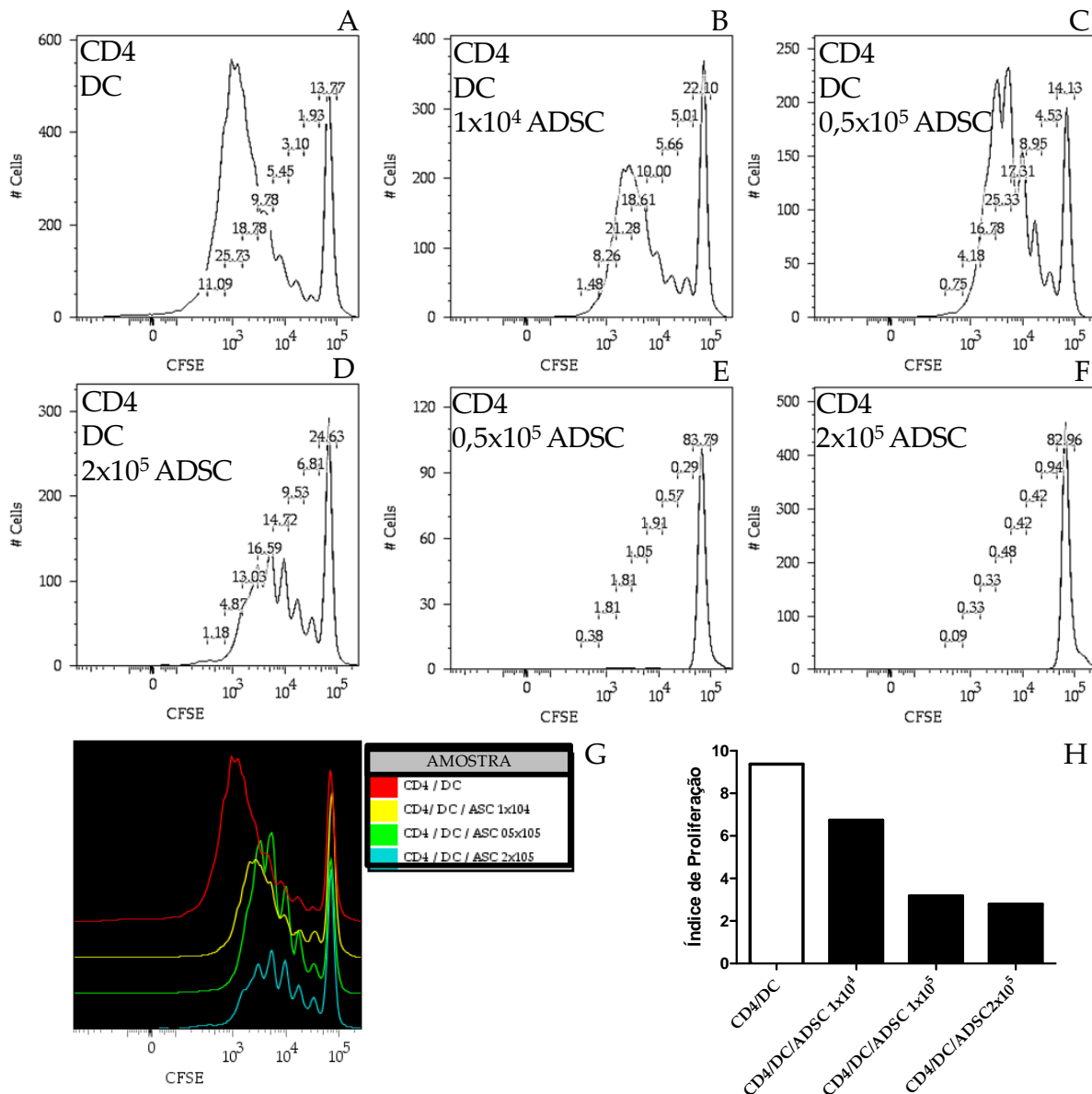


#### **4.11 Avaliação da resposta linfoproliferativa frente ao estímulo alogênico.**

Uma vez demonstrada a capacidade das ADSC em aumentar a sobrevida do enxerto alogênico, investigamos se esta maior sobrevida era relacionado a capacidade das células em suprimir a proliferação de células T aloespecíficas. Dessa forma, realizamos um ensaio de cultura mista, onde adicionamos células dendríticas maduras de animais CBA/J e linfócitos T CD4<sup>+</sup> de C57Bl/6, como descrito na secção de Material e Métodos.

As células T CD4<sup>+</sup> proliferam normalmente frente ao estímulo alogênico (Figura 18A). De forma interessante, quando adicionamos ADSC em concentrações crescentes a co-cultura, esta proliferação foi reduzida (Figura 18, painéis B, C e D). Para confirmar se as ADSC não apresentam propriedades imunogênicas, fizemos um ensaio onde elas foram adicionadas às células T CD4<sup>+</sup>, na ausência de células dendríticas, e, como esperado, as células T CD4<sup>+</sup> não proliferaram (Figura 18 E e F).

A figura 18G ilustra a sobreposição das proliferações de todos os grupos, demonstrando que as células ADSC possuem um potencial de suprimir a resposta dos linfócitos alogênicos. A figura 18H somente reforça os dados, onde analisando pelo software *FlowJO*, obtivemos o índice de proliferação, mostrando mais uma vez que essas células suprimem a proliferação dos linfócitos T.

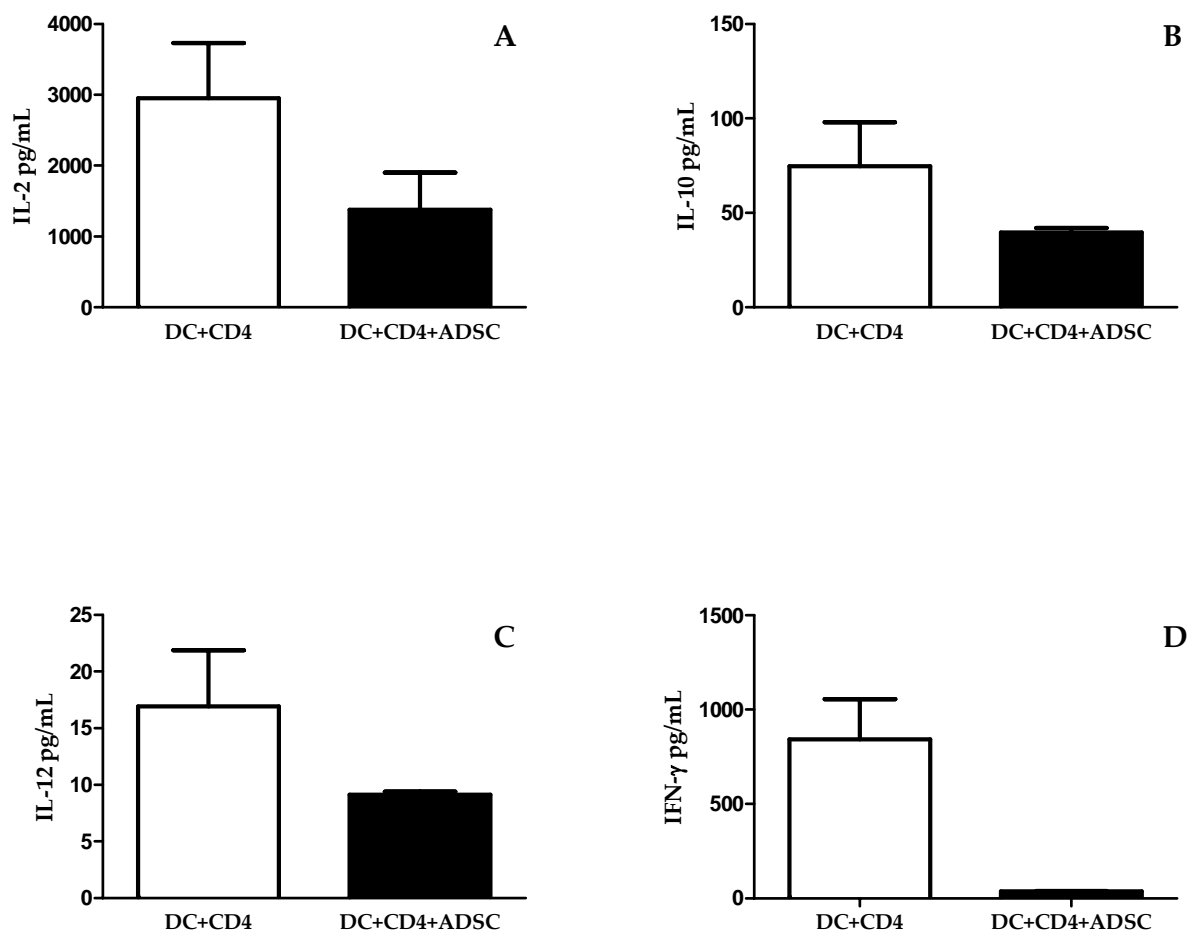


**Figura 18: Avaliação da supressão da resposta leucocitária mista (MLR) por ADSC.** Para realização do ensaio foram utilizadas  $2 \times 10^5$  células dendríticas de animais CBA/J obtidas por *beads* magnéticas e colocadas em contato com células T  $CD4^+$   $2 \times 10^5$  de animais C57BL/6 obtidas por *beads* magnéticas e marcadas com CFSE. Nesse ensaio foi adicionado ou não concentrações diferentes de ADSC. A figura (A) representa a citometria do MLR de células CD4/DC, (B) mesmo número de CD4/DC +  $1 \times 10^4$  ADSC, (C) CD4/DC +  $1 \times 10^5$  ADSC, (D) CD4/DC +  $2 \times 10^5$  ADSC, as figuras (E, F) ilustram as T CD4 juntamente com as ADSC sem diferentes concentrações  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  respectivamente. A figura (G) ilustra a sobreposição das amostras, a figura (H) ilustra em barras o índice de proliferação calculado através de software FlowJO.

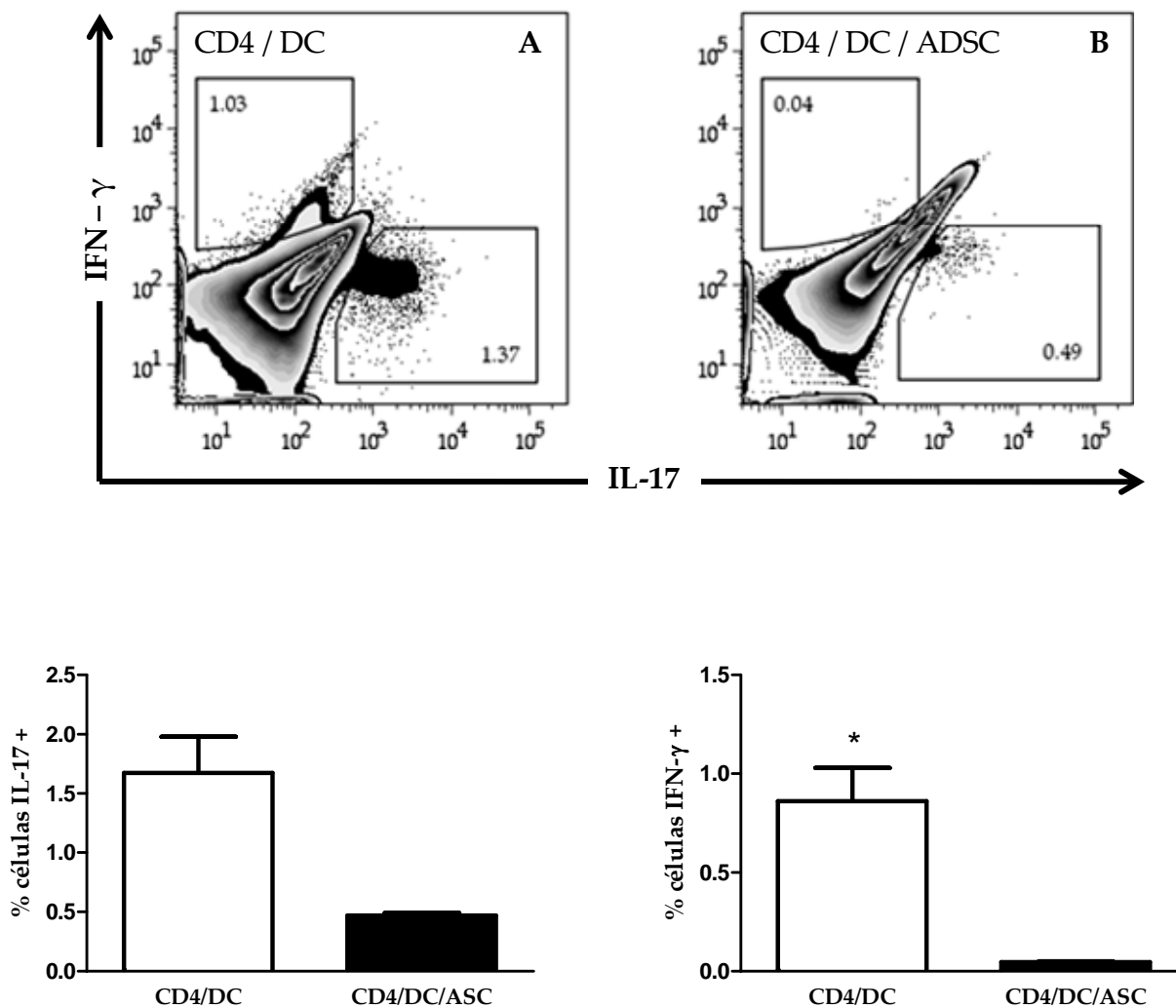
## 4.12 Quantificação das citocinas produzidas no ensaio de linfoproliferação

Estudarmos as citocinas presentes no sobrenadante dos ensaios de linfoproliferação e observamos que nos poços onde não foram adicionadas as ADSC houve uma maior produção de IL-2 (Figura 19A), se associando com uma maior proliferação das células, embora não estatisticamente significativo. Além disso, verificamos uma redução na secreção das citocinas pró-inflamatórias, IL-12 (Figura 19C) e IFN- $\gamma$  (Figura 19D) nas condições onde as ADSC estavam presentes. É importante destacar que a citocina IL-10 (Figura 19B) também se encontrava reduzida na presença de ADSC, nos levando a crer que esta citocina não tenha um papel importante em nosso modelo de estudo.

Finalmente, questionamos se as ADSC seriam capazes de inibir a secreção de IL-17 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> num ensaio de linfoproliferação. Como demonstrado na figura 20, notamos que a adição de ADSC à cultura promoveu uma inibição da produção tanto de IL-17 como de IFN- $\gamma$  (Figura 20B) quando comparados aos ensaios sem ADSC (Figura 20A). Esse dado indica que as células ADSC são capazes de inibir a resposta imune tanto de padrão Th1 como de Th17. As figuras 20D e 20E esboçam os dados obtidos de supressão da IL-17 e IFN- $\gamma$  pelas ADSC na forma de histograma.



**Figura 19: Avaliação das citocinas produzidas no sobrenadante da cultura da proliferação.** Os sobrenadantes foram recolhidos e as citocinas estudadas no BIOPLEX. Neste ensaio foram estudados dois grupos experimentais. A barra branca representa as citocinas do sobrenadante das culturas células CD4/DC, e a barra preta representa o as citocinas do sobrenadante da cultura CD4/DC +  $2 \times 10^5$  ADSC. A figura (A) ilustra IL-2, (B) ilustra IL-10, (C) ilustra IL-12 e (D) ilustra o IFN- $\gamma$ . Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 20: Ensaio de resposta linfoproliferativa mista (MLR) para análise de citocinas.** Para realização do ensaio foram utilizadas células dendríticas  $2 \times 10^5$  de animais CBA/J obtidas por *beads* magnéticas e colocadas em contato com células CD4<sup>+</sup>  $2 \times 10^5$  de animais C57BL/6 obtidas por *beads* magnéticas. Nesse ensaio foi adicionado ou não ADSC. A figura (A, B) representa a citometria do MLR de células CD4/DC e a figura (C) CD4/DC +  $2 \times 10^5$  ADSC. Essas células foram incubadas por 96 horas. Para análise das citocinas as células foram nas últimas 6 horas de incubação adicionou-se brefeldina, phorbol, ionomicina e após isso marcadas com anti-CD4 (PerCP), permeabilizadas e marcadas com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  (FITC) e anti-IL-17 (PE). As figuras (D, E) ilustram por barras os valores obtidos. Os dados foram analisados no software FlowJO. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

A literatura mundial se refere ao transplante como a melhor terapia substitutiva para a função de um órgão, levando em conta uma melhora na sobrevida global e na qualidade de vida do paciente [142-145]. Estes resultados são traduzidos pela redução na taxa de mortalidade de 6,3 para 3,8 para cada 100 pessoas ao ano, em pacientes submetidos ao transplante, no caso específico, o renal [146]. Desde a década de 50, quando os primeiros transplantes com sucesso foram realizados, a taxa de transplante sofre uma grande variação, indo de 0,3 pmp em Bangladesh a 61 pmp na Catalunha na Espanha [147]. Dados da ABTO mostram que em 2008 foram realizados 3.780 transplantes renais no Brasil, o que equivale a uma taxa de 20,1 pmp. Apesar destes números, ainda existem 34.789 pacientes em lista de espera [148]. Entre os anos de 1995 a 2003, foi registrado no Brasil um crescimento de 81,7% na taxa de transplantes. Porém, os últimos anos foram de uma frustrante estagnação ou até mesmo de decréscimo na incidência dos transplantes renais no país. Este fato explica o número crescente de pacientes em lista de espera. Assim, a busca de esforços para equilibrar o balanço entre a oferta e a procura de órgãos deve ser contínua. Estes esforços envolvem desde as iniciativas para o aumento no número de captações e na qualidade dos órgãos, até fatores que aumentem a sobrevida do enxerto renal. Apesar da descoberta de novas drogas imunossupressoras, a perda crônica do enxerto continua a ser um problema, onde a maior parte dos tecidos transplantados perde sua funcionalidade e são rejeitados ao longo dos anos, tornando necessária novas intervenções cirúrgicas. Considerando todas as informações acima, o estudo para entender melhor os mecanismos envolvidos na rejeição, assim como novas formas alternativas que possam prolongar a sobrevida do enxerto, e quem sabe induzir tolerância são fundamentais.

Neste sentido, recentemente foi demonstrado que as CTM eram capazes de reverter a rejeição aguda em transplantes de medula óssea e de pele [116, 149]. Associado a este fato, surgiram evidências que elas modulam a resposta imune, em parte por possuírem baixos níveis de expressão de MHC de classes I e II, de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86) e também por produzirem uma variedade de agentes solúveis imunorreguladores (revisto por Krampera 2006) [150]. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a capacidade das ADSC em promover um aumento na sobrevivência do transplante e associar a inibição da rejeição com um balanço entre células T reguladoras e T efectoras *in vivo*.

O transplante de pele é um pouco diferente de outros tipos de transplante vascularizados como o de coração, fígado, pâncreas e rim. Acredita-se que a presença em grande número de células dendríticas específicas presentes na pele, as células de Langerhans, descobertas em 1878 por Paul Langerhans [151], torne o enxerto muito imunogênico. Entretanto, este é um modelo largamente utilizado para o estudo de mecanismos de rejeição e de indução de tolerância. O ideal seria que os resultados obtidos com este modelo fossem re-constatados em modelos de transplantes vascularizados como o de coração, para comprovação dos achados. De acordo com a hierarquia demonstrada por Murray em 1971, onde a pele se mostrou a mais antigênica entre vários órgãos e tecidos [152], a vascularização tardia do enxerto de pele exerce uma grande influência na cinética do infiltrado celular. Num estudo de transplante de membros, o qual é composto por pele, músculo, osso e cartilagem, a pele foi a que teve uma rejeição mais acelerada [153].

Sendo assim, sem o uso de imunossupressores os órgãos transplantados são rapidamente rejeitados pelo sistema imune do receptor. As terapias imunossupressoras atuais reduzem eficientemente a resposta imune aos aloantígenos, resultando numa menor incidência de rejeição. A maior parte das drogas imunossupressoras tem como

alvo os sinais intracelulares envolvidos com a ativação de células T e da apresentação de antígenos. Porém, as terapias de longa duração com imunossupressores levam à ocorrência de inúmeros efeitos colaterais que contribuem para a redução da sobrevida do órgão transplantado [154].

Vários autores já tentaram induzir a tolerância imunológica em transplantes experimentais de órgãos, usando as próprias células do sistema imune modificadas. Billingham e colaboradores em 1953 foram os primeiros a descrever o papel da indução de quimerismo em um modelo de transplante de células hematopoiéticas para camundongos neonatais, que resultava no aceite do transplante de pele quando adultos, mas estes animais rejeitavam a terceira parte proveniente de outro camundongo [155]. Pesquisadores chineses mostraram que animais tratados com de extrato de ervas medicinais apresentavam uma diminuição de moléculas como MHC de classe II, CD80 e CD86 nas células dendríticas, o que acarretava em um aumento na sobrevida do transplante de intestino [156]. Um outro estudo usando camundongos deficientes de células T reguladoras naturais mostrou que, células dendríticas em estado quiescente carregando antígenos do doador eram capazes de mediar a tolerância ao transplante, diferente do que acontecia quando as células dendríticas estavam ativadas [157]. A tolerância ao enxerto está relacionada com a geração de Treg na periferia, como mostrado com Fazekasova e colaboradores em 2009, onde primeiro eles demonstraram que as células dendríticas tratadas com dexametasona (um potente corticosteroide) induziam a inibição da expressão gênica de *IL-12* e aumentavam a expressão de *IL-2*. Em seguida, eles realizaram ensaios *in vitro* onde demonstraram que as células dendríticas tratadas com dexametasona induziam a proliferação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, mas não das T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; porém, quando adicionavam anti-IL-2 a essa cocultura, a proliferação era inibida. Os autores sugeriram então que a propriedade



imunomoduladora das células dendríticas tratadas com dexametasona estava envolvido com a produção de IL-2, contribuindo para expansão de Treg [158].

Em nosso trabalho, não usamos drogas imunossupressoras como uma terapia adicional, apenas direcionamos nossa observação para o efeito das células-tronco na sobrevida do enxerto. Isto explica a rejeição precoce ao enxerto no grupo que não recebeu o tratamento com as células-tronco, semelhante ao observado em outro trabalho, cujos autores usaram esta mesma combinação de MHC [159].

Um dos nossos primeiros objetivos foi verificar se as células-tronco poderiam aumentar a sobrevida do enxerto, ou mesmo induzir tolerância. Do ponto de vista operacional, a tolerância ao enxerto de pele é observada quando o enxerto sobrevive por mais de 100 dias, na ausência de imunossupressão [85]. Logo, as células-tronco foram usadas com a intenção de induzir tolerância aos aloantígenos, com as mesmas características imunomoduladoras evidenciadas em modelos *in vivo* de EAE [160], de transplante de medula óssea [139], de ilhotas pancreáticas [161] e de pele [116], e também por sua capacidade de suprimir a ativação *in vitro* de linfócitos T e B [162, 163].

Distribuídas por todo o organismo e tendo precursores em cada órgão vascularizado [137], no nosso estudo utilizamos células-tronco derivadas do tecido adiposo, as ADSC, as quais possuem todas as características de uma CTM como as da medula óssea. Seguindo o mesmo conceito, Zhu e colegas recentemente demonstraram que as ADSC possuem mecanismos imunossupressores semelhantes às CTMs [164]. Em 2002, dados publicados por um grupo dos EUA mostrou a capacidade de um lipoaspirado humano se diferenciar em miócitos [165]. No mesmo ano, este grupo foi o primeiro a descrever o tecido adiposo como uma fonte potencial de CTMs [127], tornando atraente a idéia de usar as ADSC em nosso modelo.

Inicialmente, antes do uso em nossos estudos, as ADSC foram caracterizadas conforme descrito pelo Comitê de Células-tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) [138]. A identificação das ADSC se baseia na presença ou ausência de alguns marcadores de linhagens linfóides e hematopoiéticas, assim como a sua diferenciação sob determinados estímulos *in vitro* para tecidos de origem do mesoderma, endoderma e ectoderma [100, 166].

Nossos resultados mostram que quando estimuladas *in vitro* essas células se diferenciaram para adipócitos, osteócitos e condrócitos, assim como descrito na literatura [167]. Sendo assim, partimos para uma análise fenotípica evidenciando que estas células eram positivas para o marcador CD73, uma ecto- 5'-nucleotidase vinculada à proliferação celular e adesão, e também para CD44, molécula relacionada com migração celular. Sendo negativa para todos os outros marcadores como CD11c, CD31, CD34, CD45, e F4/80. Também analisamos a expressão de moléculas de co-estimulação como CD80 e o CD86, e a expressão de MHC de classe II (H-2<sup>k</sup>), sendo todas estas pouco expressas, corroborando com os dados na literatura [138]. Como um resultado complementar, pudemos observar que com o cultivo mais prolongado as expressões das moléculas contaminantes regrediram como visto na comparação entre a 2<sup>o</sup> e a 5a passagem.

Uma vez terminada a caracterização, a nossa próxima pergunta foi se estas células eram capazes de aumentar a sobrevida de um enxerto de pele totalmente alogênico. Em um experimento prévio onde transferimos a fração total de células mononucleares da medula óssea, não identificamos nenhum aumento na sobrevida do enxerto, comparado com o grupo alogênico. Sabemos que a quantidade de células-tronco presentes nesta fração é reduzida, menos de 0,05% das células dentro da medula óssea. As CTMs residem em nichos dentro da medula óssea, portanto é necessário a sua

retirada e expansão *in vitro*, para a obtenção de um número substancial de células, suficiente para serem transplantadas [104].

Ao administrarmos as ADSC, observamos um significativo aumento na sobrevida do enxerto em relação aos animais não tratados, ou sobre aqueles que receberam a fração total de células mononucleares da medula óssea, deixando evidente a capacidade dessas células em suprimir uma resposta alogênica. Entretanto, não observamos uma sobrevida indefinida. Renner e colegas demonstraram em um modelo de transplante heterotópico de coração, que animais transplantados tratados com  $2 \times 10^6$  CTM por via intravenosa, 4 dias antes do transplante, apresentavam uma rejeição acelerada (média 6 dias) [168]. Um outro grupo, usando o mesmo modelo animal de transplante de coração, mostrou que quando o tratamento com as CTM uma semana antes, no dia e 3 dias subsequentes ao transplante, a sobrevida do enxerto aumentava para 12 dias, em média [157]. Um terceiro grupo demonstrou que quando as CTM eram inoculadas no 1º ou 3º dia após transplante, estas células eram capazes de aumentar a sobrevida do enxerto de pele em babuínos de 7 para 11 dias [116]. Portanto, o número de células e o tempo de tratamento parecem influenciar a sobrevida do enxerto. Dados não apresentados do nosso grupo mostraram que o tratamento com altas doses ( $5 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$ ) não levavam a uma imunossupressão maior, ou seja, maior tempo de sobrevida do enxerto. Juntos, nossos resultados indicam que o tratamento com as células CTM aumentam a sobrevida, mas não geram tolerância ao enxerto. Acreditamos que por causa da persistência do antígeno e também pela disparidade do MHC entre receptor/doador, talvez houvesse a necessidade de um número maior de administrações, ou mesmo que o número infundido não fosse suficiente. Dados publicados pelo grupo da Profa. Katarina Lê Blanc mostraram que as células-tronco aumentavam a sobrevida do enxerto de coração, porém depois de um tempo ele apresentava sinais de rejeição, necessitando de um tratamento novamente [169].

Concomitante ao aumento na sobrevida do enxerto, nós observamos uma melhora histológica na morfologia da pele transplantada desde a fase inicial, perdurando até o 10º dia após o enxerto, mostrando uma necrose e hiperplasia reduzida no grupo tratado, onde foi possível observar uma melhor orientação e deposição de colágeno. Observamos também um maior infiltrado de neutrófilos. Alguns trabalhos mostram que essas células poderiam contribuir para rejeição do enxerto [170, 171], confirmando os achados de Morita e colegas (2001) demonstrando que a depleção de neutrófilos resultava no aumento da sobrevida de enxertos cardíacos alogênicos de 8-10 dias para 21 dias [172]. Em 2008, Larocca e colaboradores, em um modelo de transplante de pele singênico usando camundongos geneticamente selecionados para uma alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda, caracterizado pelo grande ou baixo infiltrado de neutrófilos respectivamente, observaram que o baixo infiltrado neutrofílico estava associado com uma pior aceitação do enxerto de pele [173]. Portanto, é possível que a presença destas células seja benéfica e não somente deletéria ao tecido. Existem trabalhos que mostram a importância dos neutrófilos para a neovascularização e reparo de tecidos lesionados [174, 175]. Nossos dados sugerem que as ADSC possuem uma capacidade maior de recrutar neutrófilos, e que essas células, dentro deste contexto, parecem ajudar na angiogênese tecidual por meio da liberação de agentes tróficos como o VEGF, importantes no processo de vascularização do tecido [176].

Os mecanismos participantes na modulação da resposta imune pelas ADSC envolvem a secreção de diversos fatores tróficos que podem regular a resposta imune e aumentar a regeneração tecidual. Dentre os fatores tróficos descritos aqui destacamos: TGF- $\beta$ ,IDO, HGF, prostaglandina E2 e óxido nítrico [117, 177, 178]. O TGF- $\beta$  ganha um destaque especial por ser descrito como um importante agente imunomodulador, envolvido com a geração de células T reguladoras. AS células T CD4<sup>+</sup> estimuladas *in*

*vitro* na presença de TGF- $\beta$  expressam uma alta quantidade da molécula Foxp3 na sua superfície [179]. Recentemente, mostrou-se que o *Foxp3* é um fator crucial no desenvolvimento e para a funcionalidade das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [180, 181]. Animais com deficiência para Foxp3 apresentam uma grave doença linfoproliferativa com características de autoimunidade [182], também encontrada em humanos com a síndrome de Imunodesregulação Poliendocrinopatia ligada ao cromossomo-X (IPEX, do inglês *Immunedysregulation Polyendocrinopathy X-linked syndrome*) [183].

Os diversos tipos de mecanismos de ação dessas células vêm sendo estudado por diversos grupos de pesquisa. Dentre eles, um grupo mostrou que a indução de tolerância por estas células era dependente de contato com uma resposta específica ao TCR [184]. Outros trabalhos mostraram o papel de várias citocinas solúveis como IL-10, TGF- $\beta$ , e IL-35 [185] e a importância do contato célula-célula nos trabalhos que descrevem a capacidade das células Treg produzirem perforina e granzima A [82, 90].

O potencial terapêutico dessas células em prevenir a rejeição de transplantes tem gerado um grande interesse na comunidade científica. Essas células podem ser manipuladas e geradas *in vitro* e desta forma poderiam ser infundidas nos receptores de transplante, aumentando a sobrevivência do tecido enxertado [97]. Em um modelo experimental de indução de tolerância ao enxerto de pele, foi demonstrado o papel das células T reguladoras em promover a sobrevida indefinida do enxerto, por meio de mecanismos supressores dependente de IL-10 e de CTLA-4. Experimentos realizados com anticorpos anti-IL-10 e anti-CTLA-4 mostram a neutralização do efeito protetor das células Treg e confirmam a importância de ambas na modulação da resposta imune *in vivo* [85].

Antigamente a ideia de que era possível induzir essa população de células Treg na periferia era inconcebível, uma vez que era consenso geral que essas células eram selecionadas no timo, conhecidas como células Treg naturais. Hoje sabemos que é possível induzir células Treg na periferia, iTreg, [186] seja na presença de citocinas como TGF- $\beta$  [187] ou através de contato com células como células dendríticas imaturas [188] e, mais recentemente, com as CTM [189]. Em 2005, pesquisadores demonstraram *in vitro* que as CTM produziam prostaglandina E2 e viram que esse micro-ambiente tolerogênico levava a um aumento das células reguladoras T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [117].

De volta aos nossos resultados, observamos que o aumento no tempo de sobrevida no grupo que recebeu o tratamento com as ADSC, estava associado com o aumento na expressão de Foxp3 nas células dos linfonodos drenantes nas primeiras 72 horas, porém depois a expressão se igualava ao grupo não tratado. Uma hipótese é a de que essas células teriam migrado para o enxerto, porém não notamos diferença no tecido dos grupos estudados. Ainda em relação as análises dos linfonodos drenantes, nós observamos um aumento na expressão das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ . Até recentemente, acreditava-se que a citocina IFN- $\gamma$  estava exclusivamente ligada a uma resposta imune efetora, porém trabalhos mais recentes mostraram a sua participação como um agente imunoregulador [190], e como um possível mecanismo de indução de tolerância induzido pelas ADSC. Neste trabalho, os pesquisadores mostraram no modelo de GVHD que a inoculação de CTM de animais nocautes para o receptor de IFN- $\gamma$  ou da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) não induziam tolerância, como visto nos animais tratados com CTM competentes. Em 1998, Markees e colegas já haviam demonstrado a importância do IFN- $\gamma$  no aumento da sobrevida do enxerto de pele. Os autores observaram que o transplante de pele em animais nocautes para IFN- $\gamma$ , ou mesmo em um modelo que utilizava anticorpos neutralizantes para IFN- $\gamma$  essa sobrevida era reduzida, além disso, eles fizeram uma conexão entre esta citocina e a

molécula CTLA-4 [191]. Atualmente, dez anos após esse achado o grupo da Kathryn J. Wood e colegas mostraram a importância do IFN- $\gamma$  na tolerância ao enxerto de pele e sua ligação com as células reguladoras. Neste trabalho os autores sugerem a participação do fator de transcrição STAT-1, na indução de uma população de células Treg dependente de IFN- $\gamma$  [192]. Sawitzki e colegas em 2005 descreveram o papel do IFN- $\gamma$  durante o desenvolvimento de tolerância operacional mediado pelas células Treg para aloantígenos do doador *in vivo* [193]. Esses dados corroboram com os nossos resultados e podem indicar o possível mecanismo de imunomodulação neste modelo de transplante de pele.

A IL-2 é um importante fator trófico para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores, bem como para as células Treg [194]. A importância desta citocina na biologia das células Treg pode ser evidenciada pela redução de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos animais deficientes para a cadeia alfa do receptor da IL-2 e para própria IL-2 [195]. Mesmo apresentando uma participação na indução de células reguladoras, o uso clínico de inibidores do receptor (cadeia alfa) da IL-2, como o Daclizumab® e Basiliximab®, tem sido usado na prática clínica para uma melhor sobrevida do transplante [196]. Isso se deve a alguns fatores como a reduzida frequência de células reguladoras no universo total de células T CD4<sup>+</sup> e a necessidade de um microambiente favorável para indução de células Treg. Aqui nós assumimos que esta citocina é importante para a geração, expansão e manutenção de células T reguladoras na periferia [197]. Recentemente Renner e colegas demonstraram a necessidade da interação entre a IL-2 com o IFN- $\gamma$  para as CTM induzirem uma tolerância *in vitro* [168].

Outro mecanismo de supressão das células Treg é através do metabolismo de adenosina onde a molécula CD39 que quebra ATP em ADP e ADP em AMP. O AMP é rapidamente degradado a nucleotídeo pelo CD73. A adenosina gera seus efeitos supressores ao se ligar em receptores purinérgicos acoplados à proteína G (A2A),

presente nas células T, inibindo assim a proliferação dos linfócitos T [95]. Uma vez que as ADSC possuem o CD73, este poderia ser o possível mecanismo utilizado por essas células para induzir a supressão.

A participação da IL-10 no processo de indução de tolerância mediado pelas ADSC é controversa. Os nossos resultados mostram uma maior expressão de IL-10 nos linfonodos drenantes do grupo tratado com as ADSC. Por outro lado, Puissant e colaboradores demonstraram que as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  parecem não estar vinculados aos mecanismos de supressão das células ADSC [130]. Neste estudo, eles avaliaram a capacidade de células-tronco derivadas do tecido adiposo ou da medula óssea provenientes de humanos em suprimir uma resposta proliferativa mista, e não notaram a presença dessas citocinas no sobrenadante da cultura. Corroborando com estes dados, nós observamos uma supressão na secreção de IL-10 no co-cultivo de células T CD4<sup>+</sup> com células dendríticas, no grupo de animais tratados com as ADSC. Esses resultados nos levam a inferir que as ADSC exerçam uma supressão global da resposta imune e não específica. Semedo e colegas observaram um padrão de inibição global de citocinas de padrão Th1 e Th2, sistemicamente, num modelo de inflamação renal [198].

Classicamente, as células T CD4<sup>+</sup> eram divididas em dois grupos separados de acordo com o padrão de citocinas que produzem: as que secretavam IFN- $\gamma$ , padrão Th1, e as que secretavam IL-4, padrão Th2 [15]. Sendo que, o balanço entre essas duas populações celulares era dependente do microambiente inflamatório [199].

Um trabalho realizado em animais nocautes para a subunidade p40 da IL-12 mostrou que estes animais eram resistentes ao desenvolvimento da EAE, enquanto que animais nocautes de IFN- $\gamma$  eram mais sensíveis. A identificação da IL-23, que é constituída pela subunidade p40 da IL-12 em conjunto com a cadeia p19, levou a vários



questionamentos a respeito do real papel da IL-12 e das células Th1 no desenvolvimento da EAE [200]. Foi verificado, posteriormente, que a IL-23 desempenha um papel central na indução da EAE devido a sua relação com a IL-17, e um novo subtipo de célula T foi identificada, a célula T CD4<sup>+</sup> Th17 [201, 202].

Até o momento são poucos os trabalhos que estudam o papel das células Th17 em transplantes. Apesar das dificuldades em encontrar referências na literatura, nós decidimos avaliar a participação destas células no nosso modelo. Ao analisarmos a expressão do mRNA nos linfonodos drenantes, não observamos diferença entre os grupos, em nenhum dos tempos estudados. Como outras subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>, a diferenciação para Th17 necessita de algumas citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos, como a IL-6 e o TGF- $\beta$ , e também da IL-21, citocina produzida pelas próprias Th17 em modelos murinos. Foi demonstrado que as células humanas necessitam de IL-6, IL-1 e IL-23 para uma diferenciação em Th17 [140, 179, 203]. A análise de citocina no nosso modelo não mostrou diferença na expressão de TGF- $\beta$ . Porém, nos linfonodos drenantes no grupo que recebeu o tratamento com as ADSC, observamos uma maior expressão de IL-6, sugerindo que esta citocina pode ser importante no processo de angiogênese e de reparo tecidual, uma vez que Klassen e colaboradores (2003) demonstraram que após uma lesão da medula espinhal, células-tronco do tecido medular eram capazes de produzir IL-6 em resposta aos estímulos inflamatórios [204]. Além disso, foi demonstrado que a IL-6 impede a “explosão” respiratória nos neutrófilos deixando-os em um estado quiescentes [205]. Isso explicaria a não agressão dos neutrófilos ao tecido transplantado.

Ao analisarmos a expressão de citocinas no enxerto, observamos que no 3<sup>o</sup> dia havia uma maior expressão de IL-17 nos animais não tratados, mas não na expressão de IL-6 e TGF- $\beta$ . Já no 10<sup>o</sup> dia não observamos nenhuma diferença estatística, muito embora o grupo não tratado apresentasse uma maior expressão de IL-17. Vários estudos

têm demonstrado a participação das células Th17 no processo inflamatório, com um papel importante na quimiotaxia para neutrófilos [206]. Mesmo assim, nossos dados demonstraram que o infiltrado neutrofílico foi menor no grupo não tratado, o qual apresentava uma maior expressão de IL-17. Recentemente foi visto que dependendo da concentração de IL-17 no foco inflamatório, pode ocorrer a morte precoce por apoptose dos neutrófilos [207], o que poderia explicar os nossos dados.

Outro ponto importante do nosso trabalho foi o estudo *in vitro* onde conseguimos mostrar em um ensaio de resposta antígenos específica que a adição das ADSC suprimiam a indução da IL-17 e IFN- $\gamma$  [208], confirmando assim os nossos dados obtidos *in vivo* no local da lesão, sugerindo que estas células estejam realmente atuando no enxerto. Com o auxílio da técnica de *Fish*, onde se buscou o cromossomo X e Y de célula humanas, Kerkis e colaboradores demonstraram em um modelo de distrofia muscular em cães que quando as CTMs eram inoculadas via intraperitoneal elas migravam para o local lesionado [209].

A capacidade das CTM em inibir a maturação, migração e apresentação de antígenos por células dendríticas foi demonstrado por English e colegas. O co-cultivo de células dendríticas como as CTM levava a uma incapacidade destas células em expressar CD80, CD86 e MHC de classe II após um estímulo com TNF- $\alpha$ . Também, a presença de CTM implicava em uma reduzida expressão de CCR7, CCL19 e E-caderina nas células dendríticas, importantes para o seu processo de migração [208]. Nossos dados não permitem ir muito além para afirmarmos quais as células que estão a ser diretamente inibidas pelas CTMs; células dendríticas e/ou linfócitos T. Uma vez que trabalhos *in vitro* demonstraram a supressão de células T estimuladas com mitógenos em co-cultivo com as CTM [118, 119, 177].

Deste modo, podemos sugerir que as ADSC inibem *in vivo* a participação precoce das células Th17 no modelo de transplante de pele, e em contrapartida induzem uma imunomodulação associada com o IFN- $\gamma$ . Esse balanço leva a um aumento da sobrevida do enxerto e abrem novas perspectivas para o estudo da imunobiologia dos transplantes na pesquisa básica e futuramente como uma atraente ferramenta para uso na prática clínica.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos nossos resultados, nós podemos concluir que as ADSC:

1. Aumentam a sobrevida do transplante de pele alogênico;
2. Induzem nas primeiras 72 horas após o transplante uma população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando o fator de transcrição Foxp3;
3. Após o transplante, nas primeiras 72 horas suprimem a expressão de IL-17 no enxerto;
4. Induzem uma maior expressão de IL-10 e IFN- $\gamma$  nos linfonodos em 10 dias,
5. Suprimem a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* frente ao estímulo alogênico; e
6. Inibem a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  *in vitro* pelas células T CD4<sup>+</sup> frente ao estímulo alogênico.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

- [1] Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat.* 1943 Jul;77(Pt 4):299-310 4.
- [2] Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat.* 1944 Oct;78(Pt 5):176-99.
- [3] Medawar P. Second study of behaviour and fate of skin homografts in rabbits. *J Anat.* 1945;79(157).
- [4] Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):4-9.
- [5] Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):298-300.
- [6] Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001 Oct;2(10):947-50.
- [7] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007 Mar;7(3):518-26.
- [8] Magee CC. Transplantation across previously incompatible immunological barriers. *Transpl Int.* 2006 Feb;19(2):87-97.
- [9] Ibrahim S, Dawson DV, Sanfilippo F. Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation.* 1995 Mar 15;59(5):724-8.
- [10] Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev.* 2003 Dec;196:51-64.
- [11] Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):4828-37.

---

\* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: Sample References. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- [12] Game DS, Rogers NJ, Lechler RI. Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *Am J Transplant*. 2005 Jul;5(7):1614-25.
- [13] Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004 Nov 15;104(10):3257-66.
- [14] Shen H, Tesar BM, Walker WE, Goldstein DR. Dual signaling of MyD88 and TRIF is critical for maximal TLR4-induced dendritic cell maturation. *J Immunol*. 2008 Aug 1;181(3):1849-58.
- [15] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
- [16] Killar L, MacDonald G, West J, Woods A, Bottomly K. Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells. *J Immunol*. 1987 Mar 15;138(6):1674-9.
- [17] Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*. 1990 Sep 1;172(3):921-9.
- [18] Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587-96.
- [19] Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21597-603.
- [20] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655-69.
- [21] Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15137-42.
- [22] Hopt UT, Sullivan W, Hoffman R, Simmons RL. Migration and cell recruiting activity of specifically sensitized lymphocytes in sponge matrix allografts. *Transplantation*. 1980 Dec;30(6):411-6.
- [23] Takiishi T. Caracterização da resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico em modelo experimental de transplante de pele. 2008

- [24] Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):2013-8.
- [25] Zhao Y, Swenson K, Wekerle T, Rodriguez-Barbosa JI, Arn JS, Sykes M. The critical role of mouse CD4+ cells in the rejection of highly disparate xenogeneic pig thymus grafts. *Xenotransplantation*. 2000 May;7(2):129-37.
- [26] Bishop DK, Chan Wood S, Eichwald EJ, Orosz CG. Immunobiology of allograft rejection in the absence of IFN-gamma: CD8+ effector cells develop independently of CD4+ cells and CD40-CD40 ligand interactions. *J Immunol*. 2001 Mar 1;166(5):3248-55.
- [27] Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*. 1993 Jan;42(1):44-55.
- [28] Rosenberg AS, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *J Exp Med*. 1987 May 1;165(5):1296-315.
- [29] Basha G, Lizee G, Reinicke AT, Seipp RP, Omilusik KD, Jefferies WA. MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One*. 2008;3(9):e3247.
- [30] Youssef AR, Otley C, Mathieson PW, Smith RM. Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine skin and heart allograft rejection across different antigenic disparities. *Transpl Immunol*. 2004 Dec;13(4):297-304.
- [31] Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 17;104(29):12099-104.
- [32] Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*. 2007 Feb;13(2):139-45.
- [33] Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*. 2007 Dec;19(6):409-17.
- [34] McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):445-53.

- [35] Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):4901-7.
- [36] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989 Dec 1;170(6):2081-95.
- [37] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:28-50.
- [38] Jankovic D, Trinchieri G. IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1281-3.
- [39] Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1363-71.
- [40] Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1380-9.
- [41] Cobbold SP. The hidden truth about gene expression in Tregs: is it what you don't see that counts? *Eur J Immunol.* 2006 Jun;36(6):1360-3.
- [42] Goldrath AW, Hedrick SM. Central tolerance matters. *Immunity.* 2005 Aug;23(2):113-4.
- [43] Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire protein. *Science.* 2002 Nov 15;298(5597):1395-401.
- [44] Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 2005 Aug;23(2):227-39.
- [45] Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today.* 1992 Dec;13(12):490-4.
- [46] Cohen IR. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun.* 2007 Dec;29(4):246-9.
- [47] Luna E, Postol E, Caldas C, Mundel LR, Porto G, Iwai LK, et al. Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. *Cell Stress Chaperones.* 2007 Summer;12(2):112-22.



- [48] Barron L, Knoechel B, Lohr J, Abbas AK. Cutting edge: contributions of apoptosis and anergy to systemic T cell tolerance. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):2762-6.
- [49] Bluestone JA. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol*. 1997 Mar 1;158(5):1989-93.
- [50] Greenwald RJ, Boussiotis VA, Lorschach RB, Abbas AK, Sharpe AH. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):145-55.
- [51] Anderson PO, Manzo BA, Sundstedt A, Minaee S, Symonds A, Khalid S, et al. Persistent antigenic stimulation alters the transcription program in T cells, resulting in antigen-specific tolerance. *Eur J Immunol*. 2006 Jun;36(6):1374-85.
- [52] Miller JF, Heath WR. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol Rev*. 1993 Jun;133:131-50.
- [53] Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):179-85.
- [54] Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):172-8.
- [55] Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):5900-7.
- [56] Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 1995 Jul 13;376(6536):177-80.
- [57] Romball CG, Weigle WO. Cytokines in the induction and circumvention of peripheral tolerance. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 Jun;19(6):671-8.
- [58] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- [59] Seino KI, Fukao K, Muramoto K, Yanagisawa K, Takada Y, Kakuta S, et al. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2577-81.
- [60] Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med*. 2005 Oct;11(10):1059-65.

- [61] Filaci G, Fravega M, Negrini S, Procopio F, Fenoglio D, Rizzi M, et al. Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol*. 2004 Feb;65(2):142-56.
- [62] Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al. Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*. 2004 Aug;16(8):1055-68.
- [63] Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4107-14.
- [64] Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Hegde U, Mukherji B, Chakraborty NG. Effect of CD4+CD25+ and CD4+CD25- T regulatory cells on the generation of cytolytic T cell response to a self but human tumor-associated epitope in vitro. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):984-90.
- [65] Kapp JA, Kapp LM, McKenna KC. Gammadelta T cells play an essential role in several forms of tolerance. *Immunol Res*. 2004;29(1-3):93-102.
- [66] Kapp JA, Kapp LM, McKenna KC, Lake JP. gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunology*. 2004 Feb;111(2):155-64.
- [67] Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
- [68] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994 Aug 26;265(5176):1237-40.
- [69] Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1137-40.
- [70] Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001 Jun 4;193(11):1303-10.
- [71] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.
- [72] Li S, Weidenfeld J, Morrissey EE. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol*. 2004 Jan;24(2):809-22.

- [73] Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(9):1437-43.
- [74] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:209-26.
- [75] Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3593-602.
- [76] Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):723-35.
- [77] Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1142-51.
- [78] Bayer AL, Yu A, Malek TR. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4062-71.
- [79] Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):295-302.
- [80] Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2004 Mar;34(3):623-30.
- [81] Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):503-13.
- [82] McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):311-23.
- [83] Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):847-53.
- [84] Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, Lucas PJ, Gress RE, Levine BL, et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3804-12.

- [85] Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*. 2002 Feb 1;168(3):1080-6.
- [86] Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4376-83.
- [87] You S, Leforban B, Garcia C, Bach JF, Bluestone JA, Chatenoud L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6335-40.
- [88] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353-62.
- [89] de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004 Sep;34(9):2480-8.
- [90] Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):1783-6.
- [91] Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1303-10.
- [92] Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Apr;37(4):884-95.
- [93] Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):161-7.
- [94] Bodor J, Feigenbaum L, Bodorova J, Bare C, Reitz MS, Jr., Gress RE. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):1053-9.
- [95] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1257-65.
- [96] Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2570-82.

- [97] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199-210.
- [98] Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):35-8.
- [99] Health N-Nlo: In.
- [100] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- [101] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science.* 2006 Mar 31;311(5769):1880-5.
- [102] Sujata L, Chaudhuri S. Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk. *Cell Mol Immunol.* 2008 Apr;5(2):107-12.
- [103] Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):318-24.
- [104] Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy.* 2005;7(1):36-45.
- [105] Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 May;292(5):F1626-35.
- [106] Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med.* 2008;59:311-25.
- [107] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726-36.
- [108] Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells.* 2004;6(4):369-74.
- [109] Ding S, Schultz PG. A role for chemistry in stem cell biology. *Nat Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):833-40.
- [110] Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 2004 Sep;114(6):795-804.
- [111] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.

[112] Spangrude GJ. When is a stem cell really a stem cell? *Bone Marrow Transplant.* 2003 Aug;32 Suppl 1:S7-11.

[113] Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2004 Nov;95(5):209-14.

[114] Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62.

[115] Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond).* 2005 Jul 26;2:8.

[116] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-8.

[117] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1815-22.

[118] Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003 May 1;101(9):3722-9.

[119] 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 Feb 15;75(3):389-97.

[120] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.

[121] Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):351-8.

[122] Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):841-55.

[123] Niederkorn JY, Peeler JS, Ross J, Callanan D. The immunogenic privilege of corneal allografts. *Reg Immunol.* 1989 Mar-Apr;2(2):117-24.

[124] Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2005 May 15;105(10):4120-6.

- [125] Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25.
- [126] Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005 Sep 27;80(6):836-42.
- [127] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
- [128] Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002;20(6):530-41.
- [129] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3581-7.
- [130] Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005 Apr;129(1):118-29.
- [131] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):278-94.
- [132] Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res*. 2003 Jan;11(1):65-74.
- [133] Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):295-312.
- [134] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- [135] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.

- [136] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393-403.
- [137] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
- [138] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
- [139] Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006 May 27;81(10):1390-7.
- [140] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006 Feb;24(2):179-89.
- [141] Atalar K, Afzali B, Lord G, Lombardi G. Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009 Feb;14(1):23-9.
- [142] Sesso R, Yoshihiro MM. Time of diagnosis of chronic renal failure and assessment of quality of life in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Oct;12(10):2111-6.
- [143] Neto JF, Ferraz MB, Cendoroglo M, Draibe S, Yu L, Sesso R. Quality of life at the initiation of maintenance dialysis treatment--a comparison between the SF-36 and the KDQ questionnaires. *Qual Life Res.* 2000 Feb;9(1):101-7.
- [144] Sesso R, Rodrigues-Neto JF, Ferraz MB. Impact of socioeconomic status on the quality of life of ESRD patients. *Am J Kidney Dis.* 2003 Jan;41(1):186-95.
- [145] Djamali A, Premasathian N, Pirsch JD. Outcomes in kidney transplantation. *Semin Nephrol.* 2003 May;23(3):306-16.
- [146] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999 Dec 2;341(23):1725-30.
- [147] Health BNlo. United States Renal Data System, URSDS 2002 annual data report. 2002.
- [148] Relatório Anual da ABTO -. 2008.



- [149] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004 May 1;363(9419):1439-41.
- [150] Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Aug;6(4):435-41.
- [151] Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC. The skin as an immune organ. *West J Med*. 1994 Feb;160(2):146-52.
- [152] Murray JE. Organ transplantation (skin, kidney, heart) and the plastic surgeon. *Plast Reconstr Surg*. 1971 May;47(5):425-31.
- [153] Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissue. *Immunol Ser*. 1989;46:73-96.
- [154] Lopez MM, Valenzuela JE, Alvarez FC, Lopez-Alvarez MR, Cecilia GS, Paricio PP. Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl Immunol*. 2006 Dec;17(1):31-5.
- [155] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953 Oct 3;172(4379):603-6.
- [156] Chen T, Xu H, Wang HQ, Zhao Y, Zhu CF, Zhang YH, et al. Prolongation of rat intestinal allograft survival by administration of triptolide-modified donor bone marrow-derived dendritic cells. *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10):3711-3.
- [157] Zhou HP, Yi DH, Yu SQ, Sun GC, Cui Q, Zhu HL, et al. Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft. *Transplant Proc*. 2006 Nov;38(9):3046-51.
- [158] Fazekasova H, Golshayan D, Read J, Tsallios A, Tsang JY, Dorling A, et al. Regulation of rat and human T-cell immune response by pharmacologically modified dendritic cells. *Transplantation*. 2009 Jun 15;87(11):1617-28.
- [159] Huang W, Ye Q, Huang Z, Yang D, Peng M. [Experimental study on induction of skin allograft tolerance in mice by heat shock protein 60]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008 Aug;22(8):993-7.
- [160] Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009 Aug 12.
- [161] Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes*. 2009 Aug;58(8):1797-806.

- [162] Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009 May 31;41(5):315-24.
- [163] Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*. 2009 May;37(5):604-15.
- [164] Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008 Aug;26(6):664-75.
- [165] Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Jan;109(1):199-209; discussion 10-1.
- [166] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):568-84.
- [167] Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, et al. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2008 Oct;40(8):2649-54.
- [168] Renner P, Eggenhofer E, Rosenauer A, Popp FC, Steinmann JF, Slowik P, et al. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant Proc*. 2009 Jul-Aug;41(6):2607-11.
- [169] Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 May;127(5):1293-300.
- [170] Hirayama S, Shiraishi T, Shirakusa T, Higuchi T, Miller EJ. Prevention of neutrophil migration ameliorates rat lung allograft rejection. *Mol Med*. 2006 Sep-Oct;12(9-10):208-13.
- [171] Surquin M, Buonocore S, Le Moine A, Flamand V, Goldman M, Abramowicz D. [The role of neutrophils during allograft rejection]. *Nephrol Ther*. 2005 Jul;1(3):161-6.
- [172] Morita K, Miura M, Paolone DR, Engeman TM, Kapoor A, Remick DG, et al. Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate T cell recruitment and progression of acute allograft rejection. *J Immunol*. 2001 Sep 1;167(5):2979-84.
- [173] Larocca R, Marguti I, Cabrera W, Ribeiro OG, Rizzo LV, de Moraes LV. Maximal inflammatory response benefits syngeneic skin graft acceptance. *Inflamm Res*. 2008 Mar 18.

- [174] Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, Hicklin DJ, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *Faseb J*. 2005 Dec;19(14):2005-7.
- [175] Toumi H, F'Guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat*. 2006 Apr;208(4):459-70.
- [176] Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12493-8.
- [177] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- [178] Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):228-34.
- [179] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
- [180] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
- [181] Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):337-42.
- [182] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68-73.
- [183] van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89017.
- [184] Shevach EM, Thornton A, Suri-Payer E. T lymphocyte-mediated control of autoimmunity. *Novartis Found Symp*. 1998;215:200-11; discussion 11-30.
- [185] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.
- [186] Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):253-7.

- [187] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
- [188] Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1467-77.
- [189] Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 2009 Jul;52(7):1391-9.
- [190] Feng G, Wood KJ, Bushell A. Interferon-gamma conditioning ex vivo generates CD25+CD62L+Foxp3+ regulatory T cells that prevent allograft rejection: potential avenues for cellular therapy. *Transplantation*. 2008 Aug 27;86(4):578-89.
- [191] Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J Clin Invest*. 1998 Jun 1;101(11):2446-55.
- [192] Feng G, Gao W, Strom TB, Oukka M, Francis RS, Wood KJ, et al. Exogenous IFN-gamma ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2008 Sep;38(9):2512-27.
- [193] Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med*. 2005 Jun 20;201(12):1925-35.
- [194] Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
- [195] Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*. 2005 Feb;6(2):152-62.
- [196] Sageshima J, Ciancio G, Chen L, Burke GW. Anti-interleukin-2 receptor antibodies-basiliximab and daclizumab-for the prevention of acute rejection in renal transplantation. *Biologics*. 2009;3:319-36.
- [197] Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1219-27.

- [198] Semedo P, Correa MC, Cenedeze MA, Malheiros DMA, Shimizu MH, Seguro AC, et al. Mesenchymal Stem Cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodelling properties in a rat remnant model. *Stem Cells*. 2009;Accept for publication.
- [199] Eder W, von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Apr;4(2):113-7.
- [200] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8.
- [201] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41.
- [202] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.
- [203] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):231-4.
- [204] Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov, II, Tai L, Gage FH, Young MJ, et al. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine*. 2003 May;22(3-4):101-6.
- [205] Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):151-62.
- [206] Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001 Aug 20;194(4):519-27.
- [207] Zhang ZG, He QY, Liu XM, Tang XY, Chen LZ. [Effect of Interleukin-17 on neutrophil apoptosis]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2006 Jun 18;38(3):305-9.
- [208] English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett*. 2008 Jan 15;115(1):50-8.
- [209] Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med*. 2008;6:35.



# 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](#)