

CAROLINA LAVINI RAMOS

Células mesenquimais humanas: bases moleculares da atividade imunorreguladora *in vitro*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Verônica Porto Carreiro de
Vasconcellos Coelho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2012

CAROLINA LAVINI RAMOS

**Células mesenquimais humanas: bases moleculares
da atividade imunorreguladora *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Verônica Porto Carreiro de
Vasconcellos Coelho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lavini-Ramos, Carolina

Células mesenquimais humanas : bases moleculares da atividade
imunorreguladora *in vitro* / Carolina Lavini Ramos. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.

Orientador: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.

Descritores: 1.Células tronco mesenquimais 2.Imunorregulação 3.Linfócitos T
4.Tecido adiposo 5.Mecanismos

USP/FM/DBD-359/11

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, meus mestres, sem os quais esta etapa não teria sido iniciada....

Agradecimentos

Certamente este trabalho é fruto de uma enorme dedicação, parcerias, apoio e envolvimento de um enorme grupo de mestres, educadores, familiares e amigos; portanto, agradeço de coração, a todos vocês, por cada grãozinho de areia de confiança que foi depositado dia-a-dia para que este trabalho pudesse ser construído e esta etapa concluída.

Primeiramente agradeço aos meus pais pela excelente formação que me proporcionaram, por todo carinho e incentivo desde o início da minha carreira. Certamente eu não teria chegado ao final desta etapa sem o apoio de vocês. Obrigada por me chacoalharem quando titubiei, por me ensinarem quando errei, por me abraçarem quando precisei e por vibrar sempre quando eu vibrei. Obrigada pelas madrugadas em claro me esperando voltar do lab por conta de experimentos malucos (hoje eu concordo, mas vejam como deu certo!), pelos ouvidos, que muitas vezes foram repetidamente sabatinados com as mesmas histórias, mas, mesmo assim vocês continuaram-me oferecendo grandes ensinamentos e afeto. Mãe obrigada especialmente pelas tabelas e pelas aflições que passamos juntas em todos os deadlines. Amo muito vocês!

Fezinha, minha irmã querida obrigada por estar sempre ao meu lado, me dar altas broncas, mas essencialmente por ter-me feito crescer, sempre exigindo o melhor de mim e me incentivando a dar um passo maior. Se hoje eu sou um pouquinho menos cabeça dura, devo isso a você. Obrigada por poder compartilhar cada momento da minha vida com você e saber que você sempre estará pronta, para o que der e vier, seja

perto ou longe, de dia, noite ou madrugada. Obrigada por acreditar na sua irmazinha cientista! Você é muito especial para mim!

Agradeço a minha orientadora Verônica por me introduzir ao mundo da complexidade. E que complexidade!!! Obrigada por me fazer enxergar sempre a luz no fim do túnel, pelas discussões e pelo grande crescimento científico que me proporcionou, sempre com muito rigor. Agradeço de coração a oportunidade de ter ousado e iniciado um trabalho com as jovens Pré-IC que só me trouxe alegria, em um momento em que ninguém, além de você e o Prof. Kalil, valorizavam o empenho. Obrigada por me ensinar a educar e por compartilharmos momentos maravilhosos no Projeto Imunologia nas Escolas.

Ao Prof. Jorge Kalil pela oportunidade de ter me aventurado no mundo da imunologia desde a iniciação científica, pelas discussões científicas e grandes ensinamentos. Obrigada pelas críticas sempre muito construtivas e pela excelente formação proporcionada

Agradeço imensamente á Kellen Faé, minha primeira “mãe científica” na imunologia, que me fez dar um salto enorme durante a minha iniciação científica, aprendendo a fazer ciência como “gente grande”. Devo toda minha atual responsabilidade e dedicação aos seus primeiros ensinamentos. Se não fosse você a aceitar uma aluna tão crua em imunologia na época, este trabalho nem existiria. Portanto Keke, muito obrigada por ter acreditado em mim, me acolhido, ensinado e ter me feito apaixonar pela ciência.

Agradeço aos Pesquisadores do Laboratório Dr. Edecio Cunha-Neto e Dra. Luiza Guilherme pelas discussões, sugestões e sempre disponibilidade em ajudar experimental e intelectualmente.

Gostaria de agradecer a todos do grupo Tx (Sandra Maria, Hernandez, Alessandra, Ana Claudia, Grazzi, Janaína, Daniele e Ana Paula) que contrubuíram com discussões, almoços, risadas e experimentos. Agradeço especialmente a Alessandra, Ana Paula, e Dani que me ajudaram muito nesta etapa final dos experimentos. Não podia deixar de agradecer especialmente a Sandra Maria, grande amiga e mãezona do grupo, sempre disposta a ajudar a todos que necessitavam inclusive, com abraços e conversas além de experimentos. San, você sempre me ajudou demais; rimos e nos divertimos muito em momentos bem difíceis; a citometria não existe sem você.

Ao Hernandez, causador da discórdia do grupo, mas um super amigo que ganhei nesses 3 anos de mestrado. As discussões foram intensas, mas saiba que adorei trabalhar com você. Certamente essa reta final só foi concretizada como eu queria, pois tive sua ajuda. Obrigada!

Gostaria de agradecer também aos antigos integrantes do grupo, Maísa, Pedro, Anninha, Fernanda, Vanessa, Georgia e Lin que me ajudaram e apoiaram nos momentos difíceis, em que pouca coisa dava certo.

Agradeço às amigas, Maristela e Priscila, sempre dispostas a conversar, discutir a ajudar. Certamente o meu dia-a-dia foi muito mais agradável e feliz com as altas gargalhadas que saiam de vez em.....sempre, mas nunca se esquecendo da ciência. Marix obrigada pelos peões e tubinhos, mil tubinhos, e pelas ótimas horas de discussão sentadas na frente do Calibur. Prisci, sem suas dicas a minha vida teria sido muito mais difícil. Obrigada pelas “network analysis”

Agradeço às antigas companheiras da Terapia Celular, queridas amigas Pati e Nat, obrigada pela força e apoio, sempre de prontidão! Além claro, dos divertidíssimos momentos TC que passamos juntas.

Selma, Malu, Déia Kuramoto e Luciana, sempre, dispostas a ajudar e a resolver todos os problemas de prontidão. Obrigada! Lu, obrigada pelas longas conversas sobre a vida científica. Karina e Fernanda do LIM60, muito obrigada pela troca de informações sobre citometria, foram essenciais para a continuidade do trabalho em uma fase em que nada dava certo.

Luciana e Eliane, não sei o que seria de mim sem nossas discussões sobre real time e a constante ajuda de vocês. Muito obrigada por minimizar minhas aflições.

Às amigas Nathy, Vanessa, Anninha, Karine, sempre otimistas e empolgadas e colaboradoras além de companheiríssimas de congressos!

À todo pessoal do HLA, companheiros diurnos e noturnos! Obrigada pelo carinho e sempre atenção.

Gostaria de agradecer às “gatólogas” Raquel, Lily, Amanda e Carol Luque que me fizeram apaixonar pelos bichanos e entrar de coração no mundo deles. Carol, muito obrigada por todas nossas conversas e discussões, e milhares de risadas (por sinal, é impossível ficar séria perto desse quarteto), mas especialmente por ter literalmente colocado o Théo na minha vida. Ele me ajudou muito na escrita da dissertação!

A todos os demais amigos do Laboratório, obrigada pela convivência, discussão e bons e divertidos momentos e carinho: Eliane, Samar, Raquel, Karen, Keity, Washington, Cláudio, Edil, Simoninha, Iolanda (Si e lo, a vida na cultura seria uma eterna bagunça sem vocês).

Pessoal da Vacina, só tenho a agradecer ao grupo que me acolheu assim que cheguei ao laboratório. Carlo, obrigada pelas reuniões com os alunos e pela super força no final, com a impressão da dissertação. Carlo e Karine, o Projeto Imunologia nas Escolas certamente marcou nossa pós graduação; foi muito bom trabalhar com vocês. Às meninas Raimunda e Elaine, sem vocês certamente meus experimentos não teriam sido realizados. Gostaria de agradecer também ao Sr. Jair, Sônia, Silvano, Gisele da secretaria e à Rose e Angélica da pós graduação, certamente vocês foram muito importantes para que diversas etapas fossem superadas. E um agradecimento especial àqueles que compartilharam horas de sala de cultura, dia após dia, célula após célula!

Aproveitando queria agradecer às minhas alunas, Laura Tonidandel e Isabella Bedin, que me ensinaram e me mostraram o quão importante é acreditar nos jovens e incentivá-los a construir o caminho da ciência; queridas, aprendi muito com vocês! Certamente a contribuição para minha formação foi imensa.

Ao meu cunhado André, aos meus sogros Rose e Carlos Morais que sempre me apoiaram e me incentivaram durante toda a trajetória do mestrado.

Gostaria de agradecer especialmente ao Bruno, meu namorado, companheiro, meu amigo, obrigado por estar presente em mais um momento tão importante da minha vida e por fazer dele ainda mais especial. Obrigada pela compreensão devido aos (muitos) momentos de ausência e nervosismo, sei que não é fácil ter uma namorada cientista, menos ainda é acompanhá-la nesta empreitada. Obrigada pelo carinho,

amor e bons momentos, que foram essenciais para que esta etapa fosse finalizada com sucesso.

Agradeço finalmente a Deus pelas conquistas, alegrias e pelo crescimento pessoal e profissional.

Sumário

<i>Lista de Figuras</i>	I
<i>Lista de Tabelas</i>	III
Resumo	IV
Summary.....	V
1. Introdução.....	2
2. Objetivo.....	21
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	21
3. Material e Métodos.....	23
3.1 <i>Delineamento Experimental</i>	23
3.2 <i>Sujeitos de Pesquisa</i>	24
3.3 <i>Obtenção, Cultivo e Expansão das Células Mesenquimais de Tecido Adiposo</i>	24
3.4 <i>Congelamento e Descongelamento Celular</i>	26
3.5 <i>Caracterização Imunofenotípica das AdMSC – Citometria de Fluxo (FACs)</i>	27
3.7 <i>Separação de células mononucleares de sangue periférico</i>	31
3.8 <i>Marcação de PBMC com CFSE</i>	32
3.9 <i>Cocultivo de AdMSC e PBMC para ensaios funcionais</i>	33
3.9.1 <i>Ensaio para avaliar efeito das AdMSC na proliferação celular de LT</i>	33
3.9.1.1 <i>Análise da proliferação celular por FACs</i>	35
3.9.2 <i>Avaliação do efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão celular de proteínas da resposta imune e em diferentes subpopulações de linfócitos T – FACS</i>	36
3.9.3 <i>Ensaio para avaliar efeito da interação AdMSC/PBMC na produção de citocinas nos sobrenadantes da co-culturas</i>	41
3.9.4 <i>Ensaio para avaliar o efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão gênica de um painel de moléculas da resposta imune – Real time PCR</i>	42
3.9.4.1 <i>Separação das células após o cocultivo para extração de RNA</i>	43
3.9.4.2 <i>Extração de RNA</i>	45
3.9.4.3 <i>Transcrição Reversa para Obtenção do cDNA</i>	47
3.9.4.4 <i>Escolha e validação dos primers</i>	48
3.9.4.5 <i>Análise da expressão de fatores de transcrição por qRT-PCR (PCR em tempo real)</i> 49	49
3.9.4.6 <i>Crítérios de validação das reações de PCR em tempo real</i>	51
3.9.4.7 <i>Classificação das alterações de expressão gênica</i>	51
3.9.5 <i>Testes estatísticos</i>	52
4. Resultados.....	58
4.1 <i>Caracterização morfológica e imunofenotípica das AdMSC</i>	58
4.2 <i>Diferenciação das AdMSC em adipócitos e osteócitos</i>	61
4.3 <i>Nomenclatura das células dos ensaios de cocultivo PBMC/AdMSC</i>	62
4.4 <i>Efeito das AdMSC na proliferação de PBMC induzida pelo anticorpo anti-CD3</i>	63
4.5 <i>Efeito da interação AdMSC/PBMC na produção de citocinas nos sobrenadantes das coculturas</i>	66
4.5.1 <i>Cinética com estímulo anti-CD3</i>	67
4.5.2 <i>Efeito das AdMSC na produção de citocinas</i>	68
4.6 <i>Efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão de proteínas da resposta imune nos LT e nas AdMSC</i>	83
4.6.1 <i>Análise conjunta de todos os experimentos</i>	83
4.7 <i>Efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão gênica de um painel de moléculas da resposta imune</i>	90
4.7.1 <i>Validade interna dos experimentos</i>	91
4.7.2 <i>Expressão gênica nas AdMSC sozinhas</i>	92
4.7.3 <i>Expressão gênica nos LT sem interação com as AdMSC</i>	93
4.7.4 <i>Modificação da expressão gênica após interação AdMSC/PBMC</i>	94
4.7.5 <i>Análise global</i>	97
4.7.6 <i>Análise REGULA x INFLAMA</i>	101
4.7.7 <i>Análise das interações entre as modificações da expressão gênica</i>	106
6. Discussão.....	118
7. Conclusões.....	140
8. Referências Bibliográficas.....	143
<i>ANEXO 1: Curvas de dissociação dos primers usados para as AdMSC</i>	163
<i>ANEXO 2: Curvas de dissociação dos primers usados para os LT</i>	165

<i>ANEXO 3: Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq.....</i>	<i>167</i>
<i>ANEXO 4: Termo de Consentimento para doadores saudáveis de gordura.....</i>	<i>168</i>
<i>ANEXO 5: Termo de Consentimento para doadores saudáveis de células mononucleares de sangue periférico.....</i>	<i>171</i>

Lista de Figuras

Figura 1 - Moléculas secretadas pelas MSC e sua ação parácrina sobre diversas células do sistema imune.....	9
Figura 2 - Esquema representativo da hipótese da necessidade da ativação das células mesenquimais em um nicho pró-inflamatório.	17
Figura 3 - Desenho experimental desde a coleta até os ensaios funcionais.....	23
Figura 4 - Exemplo da análise realizada para imunofenotipagem das AdMSC.....	30
Figura 5 - Estratégia de análise da proliferação com marcação CF.....	36
Figura 6 - Estratégia de análise das subpopulações de células T reguladoras.....	39
Figura 7 - Estratégia de análise de células T ativadas.....	40
Figura 8 - Estratégia de análise AdMSC.....	40
Figura 9 - Representação da extração de RNA pelo RNeasy Protect Cell Mini Kit.....	46
Figura 10 - Genes selecionados para o Super Array- Genes selecionados para serem analisados nos Linfócitos T.....	53
Figura 11 - Genes selecionados para o Super Array- Genes selecionados para serem analisados nas AdMSC.....	54
Figura 12 - Exemplo de análise da imunofenotipagem das AdMSC.....	59
Figura 13 - Imunofenotipagem das AdMSC - Porcentagem de positividade.....	60
Figura 14 - Imunofenotipagem das AdMSC - Mediana de intensidade de fluorescência.....	61
Figura 15 - Diferenciação AdMSC em adipócitos e osteócitos	62
Figura 16 - Efeito das AdMSC na proliferação de células CD3 positivas e de PBMC totais	65
Figura 17 - Capacidade supressora das AdMSC é dose dependente.....	65
Figura 18 - Capacidade supressora das AdMSC é dose dependente.....	66
Figura 19 - Cinética da produção de citocinas em PBMC estimuladas com anti-CD3.....	77
Figura 20 - Efeito das AdMSC na produção de TNF α nas co-culturas de AdMSC e PBMC estimuladas com anticorpo anti-CD3.....	78
Figura 21 - Efeito das AdMSC na produção de IL10 nas co-culturas de AdMSC e PBMC estimuladas com anticorpo anti-CD3.....	79
Figura 22 - Efeito das AdMSC na produção de IFN γ nas co-culturas de AdMSC e PBMC estimuladas com anticorpo anti-CD3.....	80
Figura 23 - Matriz de correlação de citocinas produzidas nos sobrenadantes do cocultivo, 1d, 3d e 5d nos grupos de experimentos com maior e menor capacidade supressora de proliferação.....	82
Figura 24 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas AdMSC - Porcentagem de positividade.....	84
Figura 25 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas MSC - Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI).....	84
Figura 26 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - Treg CD73+ - Porcentagem de positividade.....	87
Figura 27 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - Treg totais - Porcentagem de positividade.....	87

Figura 28 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - subpopulação Treg CXCR3+ Porcentagem de positividade.....	88
Figura 29 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - subpopulação Treg CCR4+CCR5+ Porcentagem de positividade.....	88
Figura 30 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC- subpopulação Treg CCR7+ -Mediana de Intensidade de Fluorescência.....	89
Figura 31 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC- ativação CD4 e CD8..	89
Figura 32 - Gel ilustrativo da integridade do RNA após sua extração.....	91
Figura 33 - Gel ilustrativo da reação de PCR para HPRT.....	92
Figura 34 - Quantificação relativa da expressão de mRNA nas AdMSC após o cocultivo com as PBMC estimuladas com anti-CD3.....	100
Figura 35 - Quantificação relativa da expressão de mRNA nos LT após o cocultivo com as AdMSC.....	103
Figura 36 - Resultados das modificações da expressão gênica nas AdMSC após o cocultivo.....	104
Figura 37 - Resultados das modificações da expressão gênica nos LT após o cocultivo em cada experimento.....	105
Figura 38 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nos LT, compartilhadas com os dois grupos de experimentos: com menor e maior capacidade supressora de proliferação.....	109
Figura 39 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nas AdMSC, compartilhadas com os dois grupos de experimentos: com menor e maior capacidade supressora de proliferação.....	110
Figura 40 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nos LT, exclusivas do grupo de experimentos com menor capacidade supressora de proliferação.....	111
Figura 41 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nos LT, exclusivas do grupo de experimentos com maior capacidade supressora de proliferação.....	112
Figura 42 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nas AdMSC, exclusivas do grupo de experimentos com menor capacidade supressora de proliferação.....	113
Figura 43 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nas AdMSC, exclusivas do grupo de experimentos com maior capacidade supressora de proliferação.....	114
Figura 44 - Correlações entre modificações de expressão gênica nos LT exclusivas nos ensaios com menor (esquerda) ou maior (direita) supressão de proliferação.....	115
Figura 45 - Correlações entre modificações de expressão gênica nas AdMSC exclusivas nos ensaios com menor (esquerda) ou maior (direita) supressão de proliferação.....	116
Figura 46 - Curvas de dissociação dos genes avaliados nas AdMSC.....	163
Figura 47 - Curvas de dissociação dos genes avaliados nos LT.....	165

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo para a caracterização imunofenotípica das AdMSC.....	29
Tabela 2 - Painel de proteínas avaliadas nos LT e nas AdMSC por Citometria de Fluxo.....	38
Tabela 3 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de PCR para HPRT.....	48
Tabela 4 - Caracterização imunofenotípica das AdMSC: Porcentagem de positividade.....	59
Tabela 5 - Caracterização imunofenotípica das AdMSC: Mediana de intensidade de fluorescência.....	60
Tabela 6 - Discriminação das células utilizadas nos decorrentes experimentos de cocultivo.....	63
Tabela 7 - Produção de IL-10 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das coculturas..	71
Tabela 8 - Produção de TNF α nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das cocultura..	72
Tabela 9 - Produção de IFN γ nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante diluído (1/10) das culturas.....	73
Tabela 10 - Produção de IL-2 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas.....	74
Tabela 11 - Produção de IL-4 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas.....	75
Tabela 12 - Produção de IL-5 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas.....	76
Tabela 13 - Expressão gênica nas MSC e LT cultivados sozinhos com o estímulo de anti-CD3.....	94
Tabela 14 - Classificação dos genes quanto predominantemente imunorreguladores e proinflamatórios.....	96
Tabela 15 - Principais genes com modificação da sua expressão nas AdMSC, após co-cultura com PBMC.....	99
Tabela 16 - Principais genes com modificação da sua expressão nos LT, após co-cultura com AdMSC.....	101

Resumo

Lavini-Ramos, C. Células mesenquimais humanas: bases moleculares da atividade imunorreguladora *in vitro*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

As células tronco mesenquimais (MSC) têm capacidade imunossupressora envolvendo diferentes mecanismos. No entanto, ainda não está claro o que desencadeia as diferentes vias de imunorregulação, ou mesmo o que determina a magnitude de sua capacidade supressora. A nossa hipótese é que a intensidade da atividade supressora das MSC esteja vinculada à sua capacidade de desencadear múltiplas vias moleculares, simultaneamente. Utilizamos uma estratégia experimental na qual testamos o efeito das MSC humanas do tecido adiposo (AdMSC), derivadas de diferentes indivíduos, sobre a proliferação de PBMC estimuladas, obtidas do mesmo indivíduo, visando relacionar o efeito supressor com a ocorrência simultânea de modificações imunomoleculares (expressão de mRNA e proteínas), tanto nos linfócitos T como nas AdMSC. Foram comparadas as correlações entre as modificações de expressão gênica e proteica nos ensaios com maior (> 50% inibição de proliferação de linfócitos T) ou menor (<50% de inibição) capacidade supressora. A primeira novidade do nosso trabalho é que durante a atividade supressora das AdMSC, múltiplas moléculas são acionadas, simultaneamente, nos linfócitos T (LT) e nas próprias AdMSC, indicando a importância da ação integrada de múltiplas vias moleculares. Várias dessas modificações de expressão gênica ocorreram de forma dominante (em todos os experimentos), como o aumento da expressão de IDO, ILB e MMP2 nos LT e de diversas moléculas nas AdMSC (entre elas: IDO, HLAG, IL10, PDL1, SEMAD4, MMP9, FASL e várias quimiocinas). Ademais, relatamos diversos novos mecanismos potencialmente envolvidos na atividade supressora das AdMSC humanas, entre eles, a diminuição do número de células T efetoras ativadas, CD4 e CD8 expressando ICOS e CD8 positivas expressando OX40, além do aumento do número de uma população específica de células T reguladoras (CD4+CD25^{hi}FOXP3+) expressando a ectoenzima CD73, importante na geração de adenosina, molécula com atividade imunorreguladora. Descrevemos também outras novas moléculas possivelmente envolvidas nos mecanismos de imunossupressão das AdMSC como SEMA4D, MMP9, CCL22 e RUNX3, cuja expressão aumentou nas AdMSC após o cocultivo e GARP, CTNNB1, IL1B e MMP2, nos LT. Mostramos, pela primeira vez, um perfil imunomolecular diferencial nos ensaios de maior capacidade supressora, com correlações positivas específicas entre os aumentos da expressão gênica, nos dois tipos celulares, envolvendo moléculas como HLAG e CCR4, IL13, IL4, TLR10, IL1B, GARP, S1PR1 e CTNNB1 (β -catenina), nos linfócitos T e, nas AdMSC, CCL22 com MMP9 e HLAG com FOXP3. Assim, sugerimos que a magnitude da atividade supressora das AdMSC depende da combinação de múltiplas vias moleculares mobilizadas, simultaneamente, e relacionadas com a indução de um perfil Th2, migração e sobrevivência celular, bem como com a atividade imunorreguladora. Além de apontar novas moléculas ao repertório imunomolecular da atividade supressora das AdMSC humanas, trazemos uma contribuição importante, apresentando uma visão mais ampla da rede de interações imunomoleculares envolvida na atividade supressora das MSC.

Descritores: Células-Tronco mesenquimais, Tecido adiposo, Imunorregulação, Linfócitos , Mecanismos

Summary

Lavini-Ramos, C. Human mesenchymal cells: molecular bases of the immunoregulatory activity *in vitro*. [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Mesenchymal stem cells (MSC) exhibit immunosuppressive activity operating by a variety of mechanisms. However, it is still unclear what triggers the different immunoregulatory pathways, or what determines the magnitude of their suppressive capacity. We hypothesized that the magnitude of MSC suppressive activity may be related to their capacity to activate multiple pathways, simultaneously. We used an approach in which we tested the effect of different human MSC derived from adipose tissue (AdMSC) over T cell proliferation, using PBMC obtained from a single donor. We determined the relationship between AdMSC suppressive activity and the simultaneous occurrence of immunomolecular changes (mRNA and protein expression) in both AdMSC and T cells, following AdMSC/PBMC interactions. Correlations of gene expression and protein modifications were compared in assays in which AdMSC displayed high (>50% of T cell proliferation inhibition) and low (<50% inhibition) immunosuppressive activity. The first novelty from our work is that multiple molecules are simultaneously activated, in both AdMSC and T cells, indicating the importance of an integrated action of several molecular pathways. Many of these gene expression modifications were dominantly (in all experiments) upregulated, namely: IDO, IL1B and MMP2 in T cells and several molecules in AdMSC such as: IDO, HLAG, IL10, PDL1, SEMAD4, MMP9, FASL, as well as many chemokines. We also report novel mechanisms potentially involved in human AdMSC suppressive activity, such as the decrease in the number of activated T cells, CD4 and CD8 cells expressing ICOS and CD8 positive cells expressing OX40. We also found an increase in the numbers of a specific Treg subpopulation (CD4+CD25^{hi}FOXP3+) expressing the ectoenzyme CD73, important in the generation of adenosine, a molecule displaying suppressive activity. Moreover, we report other novel molecules possibly involved in AdMSC suppressive activity, once their gene expression was upregulated in AdMSC (SEMA4D, MMP9, CCL22 and RUNX) and in T cells (GARP, CTNNB1, IL1B e MMP2), following AdMSC/PBMC interactions. We also show, for the first time, a differential immunomolecular profile in the assays with high suppressive activity, showing exclusive positive correlations among changes in gene expression, involving multiple molecules, such as HLAG with CCR4, IL13, IL4, TLR10, IL1B, GARP, S1PR1 and CTNNB1 (β -catenin) in T cells, and CCL22 and MMP9, with HLAG and FOXP3, in AdMSC. We, therefore, suggest that the magnitude of AdMSC suppressive activity depends on a particular combination of multiple immunoregulatory pathways simultaneously activated and related with the induction of a Th2 profile, cell migration and survival, as well as with immunoregulatory activity. Besides adding new players to the scenario of MSC suppressive activity, we believe our data bring a major contribution to the field, by providing a broader view of the interactive immunoregulatory molecular networks involved in MSC immunologic activities.

Key words : Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Immunoregulation, T cells, Mechanisms

Introdução

1. Introdução

O sistema imune mantém um delicado equilíbrio entre a tolerância ao próprio e a resposta contra patógenos e antígenos não próprios. Ele é formado por uma complexa rede de diversos componentes celulares e humorais que atuam de forma interconectada, na manutenção da homeostase. Qualquer desequilíbrio decorrente de falta de resposta imune (imunodeficiências) ou mesmo uma resposta exacerbada (autoimunidade e alergias) pode culminar em um estado patológico, revisado em (Kyewski e Klein, 2006).

A tolerância imunológica ao próprio é um estado fisiológico, de não agressão aos tecidos, mantido pela interação do sistema imune com antígenos próprios durante o desenvolvimento das células T e B tanto nos órgãos linfóides primários quanto secundários, onde células autorreativas potencialmente patológicas são eliminadas. Este processo inicia-se durante o desenvolvimento de células ainda imaturas no timo e medula óssea (tolerância central) e ocorre de forma continuada na periferia (Tolerância Periférica). No processo de maturação dos linfócitos T no timo, antígenos próprios, são apresentados principalmente por células epiteliais tímicas por meio da proteína codificada pelo fator de transcrição AIRE (do inglês, "*autoimmune regulator*" ou regulador de autoimunidade), revisado em (Miller, 2011). Assim, caso a ligação entre o receptor TCR e o complexo peptídeo-MHC seja de afeição intermediária esses clones são selecionados positivamente e sobrevivem (Miller, 2011).

Caso contrário, se a interação envolver uma ligação de alta avides, esses clones são selecionados negativamente e morrem por apoptose (Miller, 2011). No entanto, essa deleção não é 100% eficiente e diversos clones autorreativos, cuja interação entre o receptor TCR e o complexo peptídeo-MHC ocorreu com alta avides, podem escapar para a periferia (Miller, 2011), sendo encontrados inclusive em indivíduos saudáveis (Danke *et al.*, 2004). Os mecanismos de tolerância periférica inibem a ação desses linfócitos autorreativos contribuindo para a manutenção da homeostase e a consequente autotolerância. Assim, os principais mecanismos de tolerância que podem ou não ocorrer concomitantemente são: i) indução de morte por apoptose, também chamada de eliminação clonal; este processo se dá após repetida ativação pelo antígeno, e interação entre as moléculas Fas/FasL (receptor e antígenos envolvidos na indução de apoptose, também conhecidos como CD95/CD95L); ii) indução de um estado de anergia, onde há incapacidade de ativação e proliferação gerado pela falta de sinais coestimuladores nas APC ou pela ligação a receptores inibidores como CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) durante o processo de reconhecimento do antígeno; iii) ignorância das células T, quando estas não encontram o antígeno; iv) indução de células T reguladoras (Treg) além da v) modificação do padrão de citocinas secretadas, para um perfil mais imunorregulador, revisado em (Mueller, 2010).

Aqui, vale ressaltar que existem descritas diversas subpopulações de Treg, como por exemplo: células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, células Tr1, FOXP3⁻ (cuja supressão é mediada pela produção de IL-10), Th3 (cuja supressão é mediada pela produção de TGF- β (do inglês, *Transforming Growth Factor β*), células supressoras T CD8⁺, células NKT (do inglês, *natural killer*), células T CD4⁻CD8⁻

(revisado em TANG *et al.*, 2008). As células Treg mais caracterizadas são as Tregs naturais, com o fenótipo CD4⁺ CD25⁺Foxp3⁺ originárias do timo durante os processos ontogenéticos, revisado em (Wing e Sakaguchi, 2010). Já outras Tregs podem ser induzidas a partir de células T “naive” na periferia, porém nem todas expressam Foxp3 (Wing e Sakaguchi, 2010). As células FOXP3⁺ exercem supressão por diversos mecanismos, dependentes ou não de contato celular. Os dependentes de contato celular podem ser via CD39, CD73 ou matando a célula apresentadora de antígenos via granzimas e perforinas. Existem também mecanismos dependentes de fatores solúveis como IL-10, TGF-B, IL-35, galectinas, ou mesmo por meio da privação de citocinas, como IL-2, necessária para sobrevivência e expansão de células T efetoras, além da adenosina (Wing e Sakaguchi, 2010). O catabolismo extracelular de ATP pelas células T reguladoras gera adenosina, que se liga a receptores purinérgicos acoplados à proteína G, presente em células T, inibindo assim a proliferação destas células (Deaglio *et al.*, 2007).

Existem outras células diferentes das Treg, como as células dendríticas CD8 α -CD11b⁻ que podem também auxiliar na manutenção da tolerância periférica, ao adquirirem um fenótipo tolerogênico (Chung *et al.*, 2005), além dos macrófagos polarizados conforme estímulos específicos de ativação para o perfil M2 (Mills *et al.*, 2000).

Como pode ser observado, há uma complexa e diversa rede de células e mecanismos envolvidos na manutenção da tolerância periférica, na qual múltiplos caminhos podem ser acionados durante a imunorregulação controlando a autorreatividade potencialmente patológica. Devido a essa gama de recursos dos quais o sistema imune se utiliza para manter o equilíbrio,

levantamos a hipótese de que outras células imunossupressoras, como as células tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*), com sua atividade imunorreguladora possam ser integrantes desse complexo sistema, na manutenção da tolerância periférica. No entanto, até o momento, elas ainda não foram classificadas como tal.

As células tronco mesenquimais são células imunorreguladoras (Bartholomew *et al.*, 2002) capazes de interagir, *in vitro*, com diversas células do sistema imune dentre elas, linfócitos, monócitos, células NK, desencadeando respostas supressoras potentes e diversas conforme o microambiente ao qual são apresentadas, e contribuindo para a tolerância e manutenção da homeostase. Essas células têm sido amplamente estudadas e estão fortemente conectadas com o sistema imune, fazendo-nos acreditar no seu potencial e importante papel na manutenção da tolerância periférica.

O que caracteriza uma célula tronco é o seu estado de indiferenciação e sua capacidade de se autorrenovar além de originar outros tipos celulares mais especializados revisado em (Lemoli *et al.*, 2005). Em vertebrados, as células tronco estão presentes tanto em estágios embrionários, possuindo o caráter pluripotente, gerando qualquer tipo tecidual presente em um organismo, quanto em diversos nichos do organismo adulto, sendo capazes de manter uma constante plasticidade e regeneração, o que caracteriza sua multipotencialidade (Beyer Nardi e Da Silva Meirelles; Krampera *et al.*, 2006).

As MSC citadas anteriormente são um dos tipos de células tronco adultas com uma capacidade especial que é sua capacidade imunorreguladora. Elas são células progenitoras de origem estromal, inicialmente isoladas da medula óssea (Friedenstein *et al.*, 1966), mas, atualmente, encontradas em

todos os tecidos estudados até o momento, tanto em tecidos adultos, como medula óssea, rim, fígado, tecido adiposo (Beyer Nardi e Da Silva Meirelles, 2006), assim como em tecidos fetais (Campagnoli *et al.*, 2001), cordão umbilical (Erices *et al.*, 2000) e placenta (Igura *et al.*, 2004). Uma possível explicação para a sua localização em todos os tecidos estudados até o momento, é a sua possível origem perivascular (Covas *et al.*, 2008; Zannettino *et al.*, 2008). Os pesquisadores que defendem essa idéia acreditam que as células progenitoras mesenquimais atuem como um reservatório de MSC indiferenciadas que podem suprir a necessidade de regeneração celular de tecidos do seu microambiente, adquirindo assim, características fenotípicas relevantes àquele microambiente (Da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

A caracterização fenotípica e funcional das MSC mostra que elas apresentam uma heterogeneidade, conforme sua origem e relacionada aos métodos de obtenção e expansão aplicados *in vitro*. Até o momento, não existe qualquer marcador específico que possa discriminar as MSC. Utiliza-se, portanto, um conjunto de moléculas de superfície cuja expressão é positiva nas MSC, mesmo não sendo exclusivas delas, e outras usadas para eliminar contaminações com outras subpopulações celulares. Estas células não expressam marcadores de superfície celular de células tronco hematopoiéticas (CD34, CD54) nem marcadores de monócitos (CD14) e linfócitos (CD3, CD45); no entanto, apresentam a expressão das seguintes moléculas: moléculas de adesão vascular, CD105 (SH2, endoglina, expressa em células mesenquimais humanas e células de medula óssea), CD73 (5'ecto-nucleotidase, ligada à membrana, expressa também em subpopulações de células B e T), CD106 (VCAM-1, molécula de adesão vascular celular, do inglês, *vascular cell*

adhesion molecule-1, expressa principalmente em células endoteliais); além de moléculas de adesão intercelular como CD44 (glicoproteína de superfície, expressa em macrófagos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais), CD90 (Thy-1 expressa em neurônios e timócitos), CD29 (beta1 integrina, expressa em leucócitos) (Dominici *et al.*, 2006). Essas moléculas citadas anteriormente são comumente analisadas nas MSC, no entanto, há uma gama maior que já foi analisada nas mesenquimais originárias de tecido adiposo (Locke *et al.*, 2009).

Assim, os critérios que definem e caracterizam as MSC *in vitro* são: a sua aderência ao plástico, a sua capacidade prolongada de proliferação e seu potencial de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos, quando cultivadas (Dominici *et al.*, 2006). Apesar de ser um painel amplamente usado para caracterizar as MSC, há discussões a respeito desse perfil imunofenotípico. Algumas moléculas são moduladas (CD29, CD90, CD73), tendo sua porcentagem de positividade aumentada conforme aumentam o número das passagens das AdMSC cultivadas *in vitro* (Mitchell *et al.*, 2006). Ademais, a ausência de um marcador específico que permita a sua localização *in vivo*, e a dificuldade de se provar a característica “tronco” *in vivo*, levaram o Comitê da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISTC, do inglês *International Society for Cellular Therapy*) a sugerir que a nomenclatura mais adequada a ser adotada é de “células mesenquimais estromais”, ao invés de “células tronco mesenquimais” (Horwitz *et al.*, 2005). No entanto, como esse assunto ainda vem sendo bastante discutido, diversos grupos de pesquisadores continuam a usar MSC em suas publicações, assim como nós manteremos essa nomenclatura no decorrer desta dissertação.

Além do perfil imunofenotípico citado anteriormente, outras moléculas também foram descritas nas MSC, como receptores de quimiocinas e citocinas, além de fatores solúveis como citocinas pró e antiinflamatórias, fatores de crescimento e quimioatração (**Figura 1**). Essa variedade de moléculas contribui para as distintas funções que essas células podem exercer na angiogênese, como antiapoptótica, antifibrótica, quimiatradora, imunorreguladora e reparadora (**Figura 1**), mostrando amplo espectro de interação com outras células do organismo, assim como do sistema imune. Essa complexa rede de funções mostra uma importante multifuncionalidade das MSC. Essas atividades não são todas realizadas ao mesmo tempo, mas são acionadas conforme o microambiente para o qual essas células são recrutadas. Além disso, essas moléculas não são apenas expressas constitutivamente, elas estão sendo continuamente moduladas pelas interações com os outros tipos celulares e moléculas presentes no microambiente, como por exemplo, LIF (do inglês, *Leukemia inhibitory factor*), IL-6, IL-11 têm sua expressão aumentada ou induzida, na presença de citocinas próinflamatórias, como IL-1 β (Haynesworth *et al.*, 1996).

Essa multiplicidade nos faz pensar que para cada função exercida pelas MSC, distintos mecanismos moleculares podem ser acionados simultaneamente e que os mesmos podem variar conforme a intensidade da atividade executada.

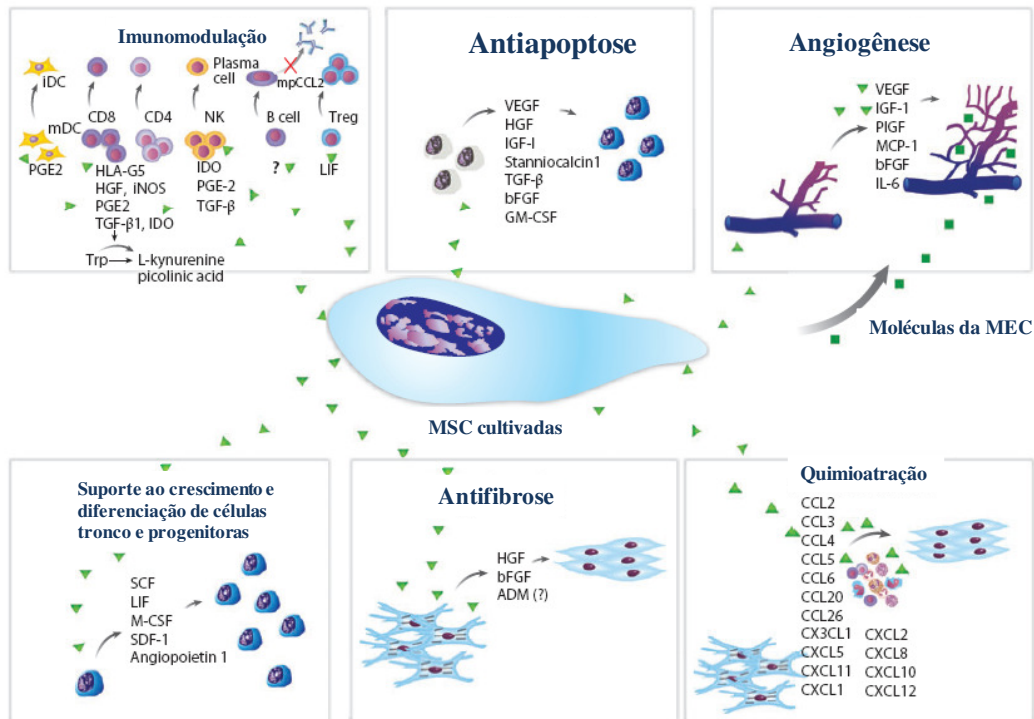


Figura 1- Moléculas secretadas pelas MSC e sua ação parácrina sobre diversas células do sistema imune – Ação imunomoduladora, antiapoptótica, angiogênica, antifibrótica, quimioatratora e de suporte para diferenciação de células progenitoras A imunorregulação das MSC consiste na inibição da proliferação de células T CD4+, CD8+, NK (do inglês, *natural killer*), supressão da produção de imunoglobulinas pelas células B, inibição da maturação de células dentricas (DC, do inglês, *dendritic cells*), e indução da proliferação de outras células reguladoras. A secreção de fatores solúveis como contribuem para esse efeito imunorregulador, dentre eles: PGE2 (do inglês, *prostaglandin E2*), HLA-G5 (do inglês, *human leukocyte antigen G5*), HFG (do inglês, *hepatocyte growth factor*), iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*), IDO (do inglês, *indoleamine-2,3-dioxygenase*), TGF- β (do inglês, *transforming growth factor β*), LIF (do inglês, *leukemia-inhibitory factor* e IL-10 (do inglês, *interleukin (IL)-10*). As MSC também inibem o processo de apoptose, principalmente por meio dos fatores: HGF, TGF- β , VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*), IGF-1 (do inglês, *insulin-like growth factor 1*), stanniocalcina 1, e GM-CSF (do inglês, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). A angiogênese é estimulada por meio da secreção de moléculas da matriz extracelular (MEC) como , VEGF, IGF-1, PlGF (do inglês, *phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein*), MCP-1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein*), e IL-6. Elas também estimulam a mitose de células tronco tissulares por meio da secreção de SCF (do inglês, *stem cell factor*), M-CSF (do inglês, *macrophage colony-stimulating factor*), SDF-1 (do inglês, *stromal cell-derived factor*) LIF e angiopoietina 1. Além disso, HGF, bFGF (e possivelmente adrenomedulina) produzidas pelas MSC contribuem para inibição da fibrose. Além disso 15 quimiocinas produzidas pelas MSC podem induzir a migração de leucócitos para a área da injúria. Adaptado de (Singer e Caplan, 2011).

Por essas características biológicas, por seu fácil acesso e sua rápida expansão, *in vitro*, além da sua preservação funcional após criopreservação por longos períodos, as MSC têm sido utilizadas em diversas terapias (Parekkadan e Milwid, 2010). Elas têm sido testadas na clínica para regenerar

tecidos danificados como ósseo, cartilaginoso (Djouad *et al.*, 2007), cardíaco, revisado em (Grigoropoulos e Mathur, 2006), e como fonte celular para engenharia tecidual de valvas cardíacas (Batten *et al.*, 2006), em terapias em diferentes contextos de doenças cardíacas, diabetes, leucemias e cânceres, doenças neurológicas, como esclerose lateral amiotrófica (Mazzini *et al.*, 2009), doença de Parkinson e doença de Huntington, entre outras, revisado em (Stoltz *et al.*, 2006). As MSC têm sido usadas, também, para tratar pacientes com *osteogenesis imperfecta* (Le Blanc *et al.*, 2005) e GVHD grave avançada (do inglês, *Graft versus Host Disease*) (Le Blanc e Ringden, 2007). Com essas terapias resultados promissores têm sido encontrados uma vez que essas células foram localizadas no enxerto e geraram células diferenciadas em osso em fetos com *osteogenesis imperfecta* (Le Blanc *et al.*, 2005). Em outro estudo, foram encontradas no sistema nervoso dos pacientes que tiveram uma melhora clínica da esclerose lateral amiotrófica, além de terem modulado o sistema imune apenas 24 horas após sua injeção, sugerindo uma ação sistêmica (Karussis *et al.*, 2010). Por outro lado, alguns estudos mostram apenas a segurança do tratamento (Mazzini *et al.*, 2009) mas não a eficácia, deixando algumas dúvidas quanto à possibilidade do uso terapêutico das MSC. Resultados negativos também já foram apontados, onde o grupo placebo apresentou melhora acima do esperado, e o estudo, nesse caso para tratamento de doença de Crohn e GVHD foi interrompido já em fase III, estudo da Osiris Therapeutics, INC. Esse atual contexto, no qual encontramos 195 estudos para o termo “mesenchymal stem cells” em www.clinicaltrials.gov, nos faz pensar que está ocorrendo um avanço demasiadamente rápido para

aplicação das MSC na clínica, uma vez que os mecanismos de ação dessa célula ainda são desconhecidos e precisam ser melhor aprofundados.

A propriedade imunossupressora das MSC também tem sido verificada em modelos animais, e em estudos clínicos e preclínicos relacionados a doenças autoimunes e rejeições de transplantes. Nestes estudos é descrito que as MSC são capazes de inibir uma resposta imune pró-inflamatória. Em modelos animais, elas foram utilizadas juntamente com células beta das ilhotas pancreáticas transplantadas em camundongos, propiciando a tolerância ao enxerto (ITAKURA *et al.*, 2007). No transplante de pele em camundongos, melhorando o GVHD e a vascularização do enxerto (Aksu *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008) entre outros. Também, após tratamento com MSC, camundongos com encefalomielite experimental autoimune (EAE do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) mostraram uma melhor neuroproteção, remielinização e neuroregeneração (Zappia *et al.*, 2005). Apesar da eficácia de seu uso, *in vivo*, as vias de ação pelas quais as MSC atuam ainda são controversas. Além disso, em função da busca pelos mecanismos de ação dessas células *in vivo* em modelos experimentais, os estudos preclínicos precisam ser mais aprofundados, uma vez que alguns estudos clínicos para GVHD, por exemplo, não se mostraram eficazes quando comparados aos grupos placebo, revisado em (Parekkadan e Milwid, 2010), ou mesmo mostraram resultados não satisfatórios, incluindo infecções recorrentes, quando uma avaliação a longo prazo foi realizada (Von Bahr *et al.*, 2011).

Analisando as MSC *in vitro*, células de diferentes espécies, roedores (Ren *et al.*, 2008), primatas não humanos (Bartholomew *et al.*, 2002) e humanos (Le Blanc, Tammik, Sundberg *et al.*, 2003) podem suprimir uma

resposta proliferativa e inflamatória mediada por linfócitos T frente a diferentes estímulos, tanto policlonais, quanto específicos (Di Nicola *et al.*, 2002; Le Blanc, Tammik, Sundberg *et al.*, 2003; Rasmusson *et al.*, 2005). Apesar da resposta inibidora ser semelhante, os mecanismos pelos quais as MSC exercem essa imunossupressão podem variar conforme o estímulo utilizado experimentalmente. Por exemplo, em uma reação linfocitária mista, há aumento de IL-2 e IL-10 nas coculturas, ao passo que utilizando-se um estímulo não específico, outras modificações distintas são observadas (Rasmusson *et al.*, 2005). A capacidade supressora não é dependente do MHC, uma vez que os mesmos resultados foram obtidos usando-se MSC com haplótipos do MHC diferentes das células respondedoras dos doadores (Le Blanc, Tammik, Rosendahl *et al.*, 2003).

Dessa forma, as MSC inibem a proliferação de células T CD4 e CD8 (Krampera *et al.*, 2006) por diversos mecanismos que serão abordados mais adiante. Foi observado que as células T estimuladas na presença das MSC ficam retidas na fase G1 do ciclo celular sugerindo uma indução da anergia (Glennie *et al.*, 2005). Percebemos, portanto, a diversidade de mecanismos que são acionados pelas MSC durante a sua atividade supressora e que uma modulação diferencial de moléculas pode ocorrer conforme o microambiente. Mas é possível que diferentes mecanismos também possam ser diferencialmente acionados conforme a capacidade supressora de cada célula em questão, conforme seu potencial supressor.

As MSC também agem sobre outras células do sistema imune, como linfócitos B, células NK e células apresentadoras de antígenos. O efeito sobre as células B ainda é controverso, uma vez que diferentes condições de cultivo

(Comoli *et al.*, 2008) podem afetar o resultado, mostrando uma indução (Traggiari *et al.*, 2008) ou inibição (Corcione *et al.*, 2006) da proliferação e diferenciação das células secretoras de anticorpos, na presença das MSC. Sobre as células NK, há inibição da proliferação induzida por IL-2 das células NK não ativadas, via PGE2 e IDO (Spaggiari *et al.*, 2008) e inibição de sua ação citolítica, via HLA-G (Selmani *et al.*, 2008), apesar de ainda ser um pouco controverso. Já sobre as células apresentadoras de antígenos, as MSC agem principalmente inibindo a diferenciação dos monócitos em células dendríticas, impedindo que as mesmas entrem no ciclo de divisão celular (Ramasamy *et al.*, 2007). Dessa forma, pode-se perceber a ampla ação das MSC sobre as distintas células do sistema imune.

Tem-se atribuído a atividade imunossupressora das MSC a diversas moléculas. São elas: prostaglandina E2 (PGE2) (Aggarwal e Pittenger, 2005; Krampera *et al.*, 2006), indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) (Meisel *et al.*, 2004), LIF (Nasef, Chapel *et al.*, 2007), HLA-G (Nasef, Mathieu *et al.*, 2007; Selmani *et al.*, 2008), TGF- β , L-10 (Klyushnenkova *et al.*, 2005; Nasef, Chapel *et al.*, 2007) e PDL1 (Augello *et al.*, 2005). Moléculas de adesão como ICAM-1 and VCAM-1 são importantes para interação entre linfócitos T e MSC, contribuindo para a sua capacidade supressora (Ren *et al.*, 2010). As MSC também podem induzir a geração Treguladoras (Batten *et al.*, 2006; Selmani *et al.*, 2008) que atuam inibindo a diferenciação de células T CD4+ naive em células do subtipo Th17 e Th1 e induzindo um fenótipo Th2.

Um outro mecanismo importante no contexto da imunossupressão exercida pelas MSC é através da indoleamina 2-3 dioxigenase (IDO) (Delarosa *et al.*, 2009). Ela é uma das moléculas induzidas por IFN- γ capazes de

controlar a inibição das células T e B (Krampera *et al.*, 2006), NK (Spaggiari *et al.*, 2008). Nesse contexto, a IDO pode ser produzida pelas MSC, catalisa a conversão do triptofano em kinurenina e inibe a proliferação de células T, uma vez que a falta desse aminoácido, exerce um importante papel na supressão da proliferação celular (Krampera *et al.*, 2006).

No entanto, o aumento da citocina IFN- γ pode estar relacionado também com o aumento de outras moléculas além IDO, como por exemplo, TGF- β e HGF (Di Nicola *et al.*, 2002). Essas moléculas possuem ação sinérgica sobre a inibição da proliferação de células T (Di Nicola *et al.*, 2002). No entanto, no contexto de supressão pelas MSC os mecanismos pelos quais o TGF- β age como imunossupressor ainda não foram estudados. Apesar disso, o TGF- β tem efeitos imunorreguladores sobre outras populações celulares, como nas células T reguladoras (Treg), decorrente da interação das células T com as DC. Tal interação promove a diferenciação de T efectoras em T reguladoras, além de induzir e estabilizar a expressão de FOXP3⁺ em células Treg (Tang e Bluestone, 2008).

Outro mediador solúvel secretado pelas MSC e importante imunorregulador é a PGE₂ (Aggarwal e Pittenger, 2005; Krampera *et al.*, 2006). Na presença de indometacina, um inibidor de PGE₂, há um restabelecimento parcial da proliferação celular (Aggarwal e Pittenger, 2005; Spaggiari *et al.*, 2006). No entanto, se tratada juntamente com um inibidor da IDO, o restabelecimento da proliferação é mais eficaz, mostrando a sinergia de atuação entre essas 2 moléculas durante a imunossupressão (Aggarwal e Pittenger, 2005; Spaggiari *et al.*, 2006). Além disso, a PGE₂ é potente moléculas lipídica, podendo estar envolvidas em etapas essenciais da

imunorregulação, favorecendo uma resposta polarizada para Th2 com produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (Harris *et al.*, 2002). No entanto, a ação das PGE₂ em conjunto com outras moléculas, poderia ser mais estudada no contexto da imunorregulação pelas MSC, para melhor compreender a interação desta, com outras moléculas que sinergicamente contribuiriam para um desfecho inibitório mais eficaz.

O HLA-G é um tipo de molécula HLA de classe I não clássica que pode estar expressa tanto na membrana celular (HLA-G1) como na forma solúvel (HLA-G5) (Carosella *et al.*, 2008). Em ambas as formas, esta molécula exerce atividades tolerogênicas. Essas propriedades têm sido descritas pela sua interação com receptores inibidores presentes em células NK, T e APC (Carosella *et al.*, 2008). A isoforma solúvel da molécula de HLA-G foi primeiramente descrita como tolerogênica na interface materno-fetal (Hunt *et al.*, 2005), mas ainda pouco se estuda no contexto das MSC. Esta molécula foi encontrada em baixa expressão na superfície das MSC, mas também pode ser uma molécula secretada pelas MSC (Nasef, Mathieu *et al.*, 2007). A forma solúvel pode ser relacionada com um papel imunorregulador, pois ao se utilizar 87G, um inibidor de HLA-G, nas co-culturas foi obtido um bloqueio de 35% da supressão da proliferação das células T (Nasef, Mathieu *et al.*, 2007). Além disso, a isoforma solúvel, HLA-G5, secretada pelas MSC após o estímulo com IL-10, pode também inibir a atividade citotóxica das células NK e CD8, polarizar para uma resposta Th2 e induzir a expansão de células T reguladoras (Selmani *et al.*, 2008).

O envolvimento de óxido nítrico (NO), por meio da inibição da fosforilação de STAT5, foi descrito em modelos de camungondos na supressão

mediada pelas MSC (Sato *et al.*, 2007). Apesar disso, comparando-se com experimentos envolvendo contato direto, e a condição sem contato, foi observado que a menor inibição na condição sem contato ocorreu por NO ser instável e perder sua atividade antes de entrar em contato com as células T. No entanto, num ambiente inflamatório, na presença de IFN- γ , juntamente com outras citocinas próinflamatórias como TNF- α , IL-1 β , ou IL-1 α , há a ativação das MSC que passam a produzir altos níveis de quimiocinas (CXCL9, CXCL10, CXCL11) juntamente com iNOS (Ren *et al.*, 2008). Estas quimiocinas atratoras favorecem o contato celular, levando a uma migração das células T para a proximidade das próprias MSC, onde a resposta proliferativa de T é inibida pelo NO (Ren *et al.*, 2008).

Recentemente, tem sido bastante discutido que o “milieu” próinflamatório pode aumentar a capacidade supressora das MSC via IFN- γ (Dazzi e Marelli-Berg, 2008) ou via TNF- α , IL-1 α , e IL-1 β (Ren *et al.*, 2008) (**Figura 2**). Mas, é importante salientar que, dependendo do estímulo, ou do conjunto que moléculas que compõe este microambiente, a resposta das MSC será distinta em termos de produção protéica e expressão gênica (Crop *et al.*, 2010), e até mesmo de intensidade de inibição (Le Blanc, Tammik, Sundberg *et al.*, 2003; Rasmusson *et al.*, 2005). Isso nos mostra que a variabilidade funcional das MSC pode ser dependente, dentre outros fatores, do estímulo utilizado e da heterogeneidade celular. Por exemplo, a expressão de PDL-1 e IDO, moléculas essas envolvidas na inibição exercida pelas MSC pode ser induzida por IFN- γ , e não por TNF- α , ao passo que prostaglandina pode ser induzida por ambas citocinas, mas não se mostrou essencial para a imunossupressão (English *et al.*, 2007). Por outro lado, a produção de quimiocinas como CXCL10

e CXCL9 e de iNOS, importantes para imunossupressão, pode ser induzida na presença de IFN- γ juntamente com TNF- α , IL-1 α , e IL-1 β (Ren *et al.*, 2008).

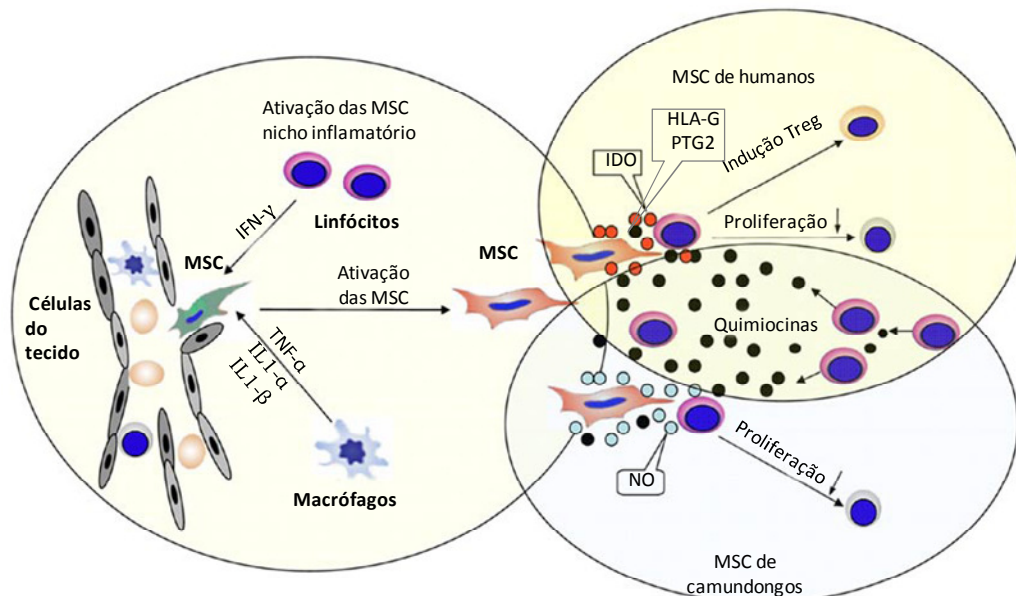


Figura 2- Esquema representativo da hipótese da necessidade da ativação das células mesenquimais em um nicho pró-inflamatório. As MSCs recrutadas são prontamente ativadas citocinas pró-inflamatórias secretadas por linfócitos e macrófagos, e liberam fatores imunorreguladores como IDO, PGE2, HLA-G e NO. Adaptado de (Shi *et al.*, 2010).

CROP e colaboradores (2010a) também mostram que as mesmas AdMSC quando cultivadas sob estímulos distintos, um alogeneico e outro composto por um coquetel de citocinas pró-inflamatórias, exibem um perfil dos mecanismos que são diferencialmente acionados. Assim, mais uma vez é nítida a importância dos fatores e células presentes na proximidade das MSC e que podem afetar diferentemente a atividade das MSC, ativando distintas vias de imunorregulação (Crop *et al.*, 2010; Kronsteiner *et al.*, 2011). No entanto, as interações entre esses mecanismos, e quais estão sendo sinergicamente acionados e quais determinam uma maior supressão ainda precisam ser melhor elucidados.

Apesar da grande maioria dos pesquisadores da área atribuir aos fatores solúveis o papel imunossupressor predominante, como mencionado acima, o contato celular tem se mostrado bastante importante para o desfecho da inibição da resposta imune (Gonzalez-Rey *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2010). A necessidade de se entender onde esses fatores solúveis atuam e que outras moléculas eles poderiam induzir nas células do sistema imune, durante a atividade supressora das MSC, trouxe à tona um novo foco nos estudos, as moléculas de adesão na imunossupressão.

As moléculas ICAM-I e VCAM-I foram recentemente descritas como necessárias para a interação e adesão entre AdMSC e linfócitos T e, conseqüentemente, para a imunossupressão mediada pelas AdMSC, além de ser também moléculas moduladas positivamente por um estímulo próinflamatório como IFN- γ , TNF- α , IL-1 α (Ren *et al.*, 2010). A migração das AdMSC para os sítios de inflamação onde exercem sua função imunossupressora também é dependente de CD44, MMP9 (metaloproteinase-9) e VCAM-1, moléculas essas que são moduladas positivamente pela ação de NF-kappaB sob a influência de TNF- α (Bocker *et al.*, 2008).

Além de fatores solúveis e moléculas de adesão, a resposta imune celular é controlada por diversas outras interações moleculares que podem levar a uma inibição de sinais de ativação como por meio de CTLA-4 (CD152)/B7 (CD80) ou B7-2 (CD86) e Fas (CD95)/FasL (CD178), entre outros. O envolvimento de PD-1 (do inglês, *ligand programmed death receptor-1*), uma molécula homóloga às moléculas B7, e seus ligantes PD-L1 (pouco expresso constitutivamente na membrana das MSC) e PD-L2, na imunorregulação exercida pelas MSC constitui uma descoberta recente (Augello *et al.*, 2005). A

ativação da via de PD-1 leva à inibição da proliferação de células T e à secreção de citocinas como o TGF- β e IL-10 (Augello *et al.*, 2005). As MSC podem aumentar a expressão de PD1-L em sua superfície na presença de um estímulo como IFN- γ e, juntamente com IDO, contribuir para o desfecho da imunorregulação (English *et al.*, 2007). Assim, a via de PD-1 na imunossupressão não tem sido um mecanismo predominantemente observado, havendo a possibilidade que outras vias além da IDO possam estar atuando em conjunto, sinergicamente, o que explicaria alguns resultados controversos da literatura.

Assim, o desfecho de uma resposta imunorreguladora envolve um equilíbrio qualitativo e quantitativo de diversos tipos celulares e fatores solúveis presentes num determinado microambiente. A atividade supressora exercida pelas MSC parece envolver uma variedade de mecanismos que podem depender tanto da heterogeneidade das populações de MSC, como da natureza do estímulo antigênico, do microambiente e de fatores solúveis nele presentes. Porém, essa diversidade de resposta pode também revelar principalmente os múltiplos caminhos para a imunorregulação que são diferencialmente acionados conforme a maior ou menor potência inibitória de cada MSC. Acreditamos que uma análise simultânea de um painel de moléculas envolvidas na resposta imune, pode nos fornecer informações importantes sobre os múltiplos fatores envolvidos na interação de células do sistema imune com as AdMSC, e que sejam responsáveis pela magnitude de sua atividade supressora.

Objetivo

2. Objetivo

O nosso objetivo foi determinar a relação entre a intensidade da capacidade supressora das células mesenquimais humanas, *in vitro*, e a modulação simultânea de moléculas relacionadas à resposta imune.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar um perfil de expressão gênica predominante das células mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (AdMSC) induzido com a sua atividade imunorreguladora
- Identificar um perfil de expressão gênica predominante dos Linfócitos T induzido com a atividade imunorreguladora das células mesenquimais.
- Determinar o efeito da atividade supressora das AdMSC nas diferentes subpopulações de células T reguladoras e na expressão de moléculas da resposta imune, nos linfócitos T e nas AdMSC.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Delineamento Experimental

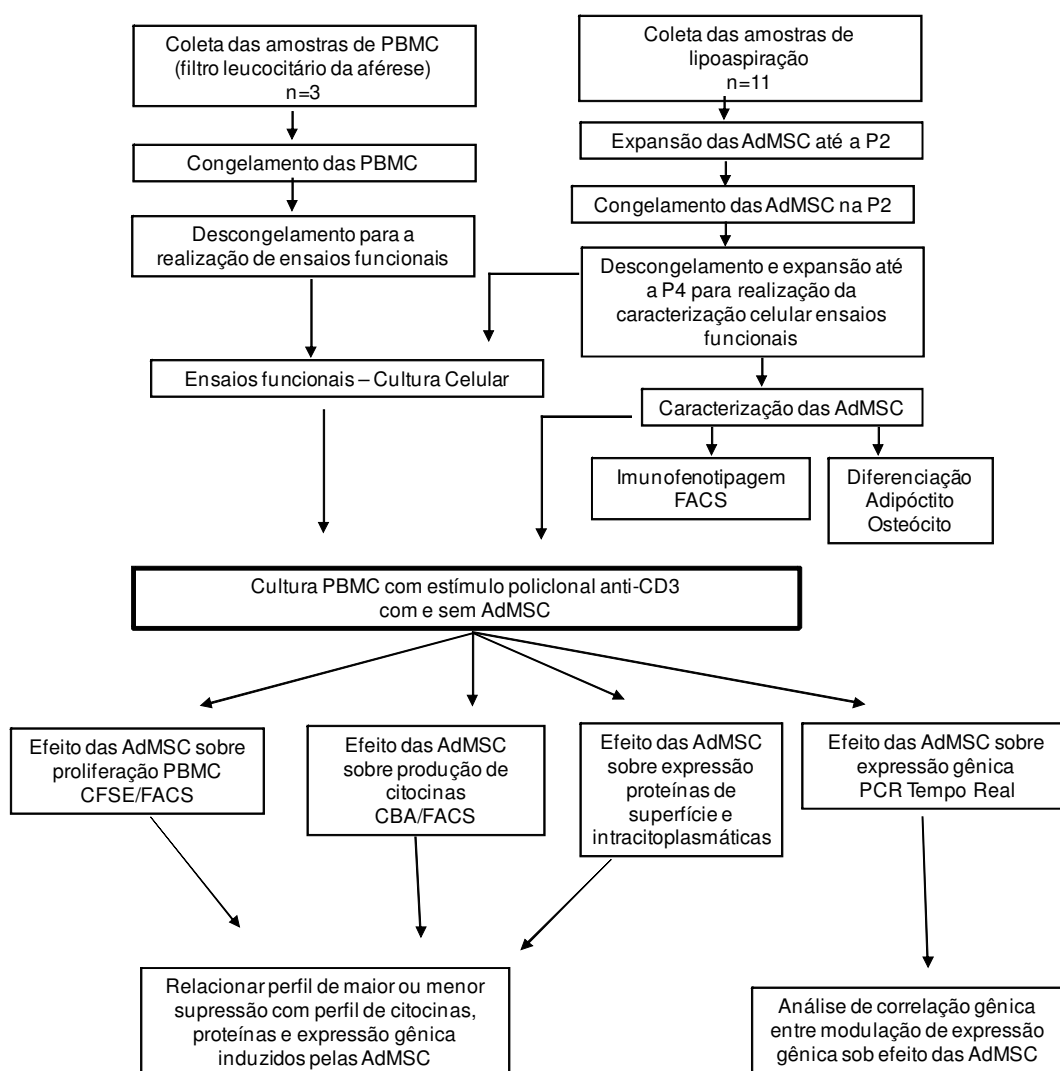


Figura 3- Desenho experimental desde a coleta até os ensaios funcionais.

P= passagem célula; AdMSC= Células mesenquimais de tecido adiposo; CBA= Cytometric Bead Array; FACS= Citometria de Fluxo; αCD3= anticorpo solúvel anti-CD3; PBMC= células mononucleares periféricas.

3.2 Sujeitos de Pesquisa

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina (Protocolo nº 0765/09) e pela Comissão Científica da Fundação Pró-Sangue (Projeto nº 005/2009), o que nos permitiu a coleta das amostras de gordura de lipoaspiração (n=11) e de células mononucleares provenientes do filtro leucocitário da doação de plasmaferese. Todo o material foi coletado apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Dos doadores de gordura, 73% eram do sexo feminino e 27% do masculino. Calculamos o índice de massa corpórea (IMC) dos doadores de acordo com a fórmula $\text{peso}/\text{altura}^2$ e os classificamos da seguinte forma:

IMC < 18,5 = abaixo do peso; 18,5 > IMC < 25 = normal;

25 > IMC < 30 = acima do peso; IMC > 30 = Obeso

A idade média das mulheres foi de 40 anos (variando de 28 a 67 anos), e a maioria encontrava-se acima do peso. Já a idade média dos homens foi de 41 anos (variando de 34 a 49 anos) e a maioria foi classificada como obeso.

3.3 Obtenção, Cultivo e Expansão das Células Mesenquimais de Tecido

Adiposo

Para isolar as células mesenquimais do estroma do tecido adiposo humano, cada 20ml do material obtido nas cirurgias foram digeridos com uma solução contendo 20ml de meio de cultura com baixo teor de glicose (ALPHA MEM Low Glucose, Gibco, Rockville, MD, EUA) acrescidos de 20mg de colagenase IA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 200mg de albumina sérica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 20ul do antibiótico gentamicina

(40mg/ml) (Novafarma, GO, BR) e em seguida, incubado a 37°C por 30 minutos, com agitação constante. Após esse período, as enzimas foram inativadas adicionando-se 5ml de soro fetal bovino (FBS, do inglês, *fetal bovine serum*, Hyclone, South, Logan, UT, USA). Em seguida, a preparação centrifugada a 400g por 15 minutos, e o precipitado de alta densidade formado foi ressuscitado em 20ml ALPHA MEM (Gibco, Rockville, MD, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone, South, Logan, UT, USA). Posteriormente, 10ml da suspensão celular foram plaqueados em uma placa (Jet Biofil, Guangzhou, China) de 100mm² e armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Durante três dias seguidos, a cada 24 horas, cada placa foi cuidadosamente lavada com tampão fosfato de sódio preparado em nosso laboratório (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*), e teve o meio de cultura trocado, de forma a remover gradativamente as hemácias e debris celulares oriundos da extração. Após esses três dias, o meio de cultura foi trocado a cada 72h. Quando as células alcançaram 80% de confluência, as placas foram tripsinizadas (0,25% tripsina-0,025% versene, ATV, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) e a cultura expandida para garrafas de 175mm². Então, as células foram expandidas em cultura até a passagem 2 (P2) e congeladas em N₂ líquido.

Para a realização de nossos experimentos descongelamos as células e as cultivamos até a P4-P6. As células foram mantidas em níveis subconfluentes quando plaqueadas (no máximo 80%) para minimizar processos de diferenciação espontâneos. A tripsinização consiste no seguinte protocolo: lavagem da garrafa com tampão DPBS (do inglês - *Dulbecco's*

Phosphate Buffered Saline) (Gibco, Rockville, MD, USA) para retirada do meio de cultura; adição de 7 ml de tripsina (0,25% tripsina-0,025% versene, ATV, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) por garrafa de 175cm²; incubação por 3 min a 37°C; agitação da garrafa para descolamento das células aderentes e, por fim, adição de meio com soro bovino fetal para inativação da tripsina. As células foram colocadas em um tubo de 12 ml para centrifugação a 600g por 8 minutos e, após esta centrifugação, foram contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas nas devidas concentrações e condições de cultivo. Este procedimento foi repetido 4 vezes para obtenção de uma população celular mais homogênea. Todos os outros ensaios foram realizados com essa população celular.

3.4 Congelamento e Descongelamento Celular

As AdMSC foram congeladas na P2 para posterior expansão até a P4 e realização dos experimentos. As suspensões de AdMSC foram centrifugadas a 600g por 8 minutos e ressuspensas ($2,5$ a 5×10^6 células/ml) em solução de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino inativado (Hyclone, South, Logan, UT, USA), e 10% DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Alíquotas de 1 ml foram distribuídas em tubos de congelamento previamente resfriados, deixando-as, primeiramente, em um recipiente contendo álcool isopróprico, que permite o gradativo congelamento das células a -80°C e, posteriormente, armazenado-as em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento, os tubos foram transferidos do nitrogênio líquido para o banho-maria a 37°C, por alguns segundos. Esta suspensão de células foi transferida para outro tubo contendo 10 ml de meio RPMI (Roswell

Park Memorial Institute, Gibco, Rockville, MD, USA) enriquecido com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 40 µg/ml de gentamicina (HC-USP, SP, Brasil), 20µg/ml de cefalosporina (Peflacin®, Rhodia, SP, Brasil) e 10% de soro fetal bovino inativado (SBFi, Hyclone, South, Logan, UT, USA). Após duas centrifugações a 600g por 8 minutos, a viabilidade celular foi determinada através do corante vital Azul de Tripán (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA). Para os ensaios posteriores apenas utilizamos as células com viabilidade maior do que 85% ao ser descongelada.

3.5 Caracterização Imunofenotípica das AdMSC – Citometria de Fluxo (FACs)

Para caracterizar as AdMSC imunofenotipicamente, utilizamos os marcadores celulares descritos na (**Tabela 1**). Foram utilizadas ao menos 200.000 células obtidas por tripzinização (conforme metodologia descrita anteriormente) para cada condição testada (17 condições com marcações FITC (isoticianato de fluoresceína, do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) PE (ficoeritrina, do inglês, *phycoerythrin*) ou PE-CY5 (ficoeritrina Cy5, do inglês, *phycoerythrin* CY5). O ensaio foi desenvolvido da seguinte maneira: as células foram adicionadas na placa de 96 poços e centrifugadas a 600g por 5 minutos para eliminar o meio de cultura. Posteriormente, adicionamos 200µl em cada poço de tampão de lavagem de citometria (PBS+ 2% Soro Bovino Fetal + 0,02% Azida Sódica) e a placa novamente centrifugada. Este procedimento foi realizado 2 vezes. Logo em seguida, adicionamos 25µl de cada anticorpo (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA), previamente titulado, já marcado

com fluorescência nos devidos poços da placa. Os anticorpos foram incubados por 30 minutos no escuro no gelo, quando então adicionamos 150µl de tampão de lavagem e centrifugamos a amostra retirando-se o sobrenadante por inversão. A lavagem foi repetida e as amostras passadas para tubos de citometria e adquiridas no citômetro FacScalibur (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Foram adquiridos 20.000 eventos na região selecionada por tamanho e granulosidade, conforme estratégia de análise exemplificada na (**Figura 4**). Realizamos a análise utilizando o programa FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR) considerando tanto da intensidade de mediana de fluorescência (MFI) quanto a porcentagem de positividade celular para cada molécula, individualmente.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo para a caracterização imunofenotípica das AdMSC

Anticorpos	Marcação Fluorocromo	Moléculas identificadas/células expressas	Resultado Esperado
CD90 (5E10)	FITC	Thy-1 – neurônios, timócitos, MSC	+
HLA-ABC (G46-2.6)	PE	molécula MHC de classe I - todas células nucleadas, MSC	+
CD49e (IIA1)	PE	α 5 integrina (VLA5) - diversas células como mastócitos, timócitos, células T ativadas e células B, MSC	+
CD13 (WM15)	PE	Aminopeptidase N – monócitos, granulócitos e cels endoteliais, MSC	+
CD73 (AD2)	PE	5'ecto-nucleotidase ligada à membrana – nerônios, células T ativadas, MSC	+
CD29 (MAR4)	PE	α 1- integrina - leucócitos	+
CD44 (G44-26)	FITC	Pgp-1, Hermes – leucócitos e hemácias	+
CD105 (266)	PECY5	SH2, endoglina – células mesenquimais humanas, células de medula, macrófagos	+
CD106 (51-10C9)	PE	VCAM-1 – linfócitos, basófilos, células dendríticas foliculares e MSC	+/-
CD14 (M5E2)	PE	Proteína com domínios de leucina - Monócito, macrófagos, neutrófilos e polomorfonucleares	-
CD31 (WM59)	FITC	PECAM-1 - plaquetas, monócitos, granulócitos, linfócitos B, células endoteliais	-
CD51/61 (23C6)	FITC	CD51 subunidade da b Integrina -plaquetas, cels endoteliais, leucócitos e megacariócitos CD61 subunidade da a Integrina- plaquetas e megacariócitos	-
CD133 (AC133)	PE	Glicoproteína Prominina1 – precursores hematopoiéticos de medula, células sangue de cordão umbilical, células sangue mobilizado.	-
CD45 (HI30)	PE	Tirosina fosfatase - linfócitos T e B	-
HLA-DR(G46-6)	PE	molécula MHC de classe II – macrófagos, linfócitos B e células dendríticas	-
CD34	PE	glicoproteína de membrana- precursores hematopoiéticos, células estromais de medula	-

Os ensaios foram realizados com marcações simples para cada condição. Foram utilizados 16 anticorpos (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA) marcados para caracterizar a população de MSC, e uma condição de controle negativo utilizando apenas células não marcadas.

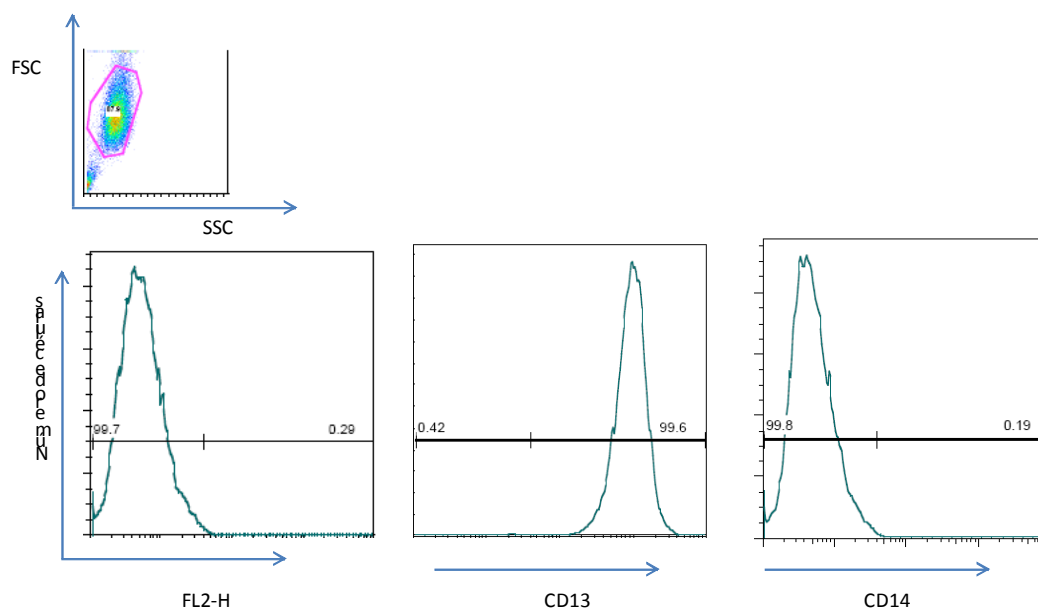


Figura 4 - Exemplo da análise realizada para imunofenotipagem das AdMSC. Foram adquiridos 20.000 eventos na região R1 mostrado no gráfico de tamanho por granulosidade (FCSxSSC). Cada fluorescência é analisada individualmente por histograma, tanto pela porcentagem de positividade quanto para mediana de intensidade de fluorescência. Acima está exemplificado da esquerda para direita, o controle negativo (somente célula, sem fluorocromo), células positivas para CD13 e negativas para CD14.

3.6 *Diferenciação das AdMSC em adipócitos e osteócitos*

As AdMSC foram submetidas a protocolos para diferenciação em osteócitos e adipócitos, visando preencher os critérios de caracterização, juntamente com sua capacidade de aderência e caracterização imunofenotípica. O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o α -MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 15% SBF, suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para a

diferenciação em osteócitos usamos o meio α -MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 7,5% SBF suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 100 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β glicerolfosfato (Reagem, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para a avaliação da morfologia das células após a diferenciação, fizemos colorações do tipo: Oil Red e Von Kossa para adipócitos e osteócitos, respectivamente.

3.7 Separação de células mononucleares de sangue periférico

A separação das células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foi realizada a partir do material do filtro para remoção de leucócitos, proveniente da doação de plaquetas por plasmaferese. As amostras foram diluídas 1:20 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após a centrifugação a 600g por 25 minutos, as células mononucleares foram coletadas, ressuspensas com salina e centrifugadas a 700g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento celular foi lavado duas vezes. Nessas lavagens, as células eram ressuspensas em meio RPMI (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) e centrifugadas novamente a 600g por 8 minutos. As células foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI e centrifugadas a 300g por 8 minutos para a remoção de plaquetas. As células foram ressuspensas em 3 ml de RPMI (Roswell Park Memorial Institute) enriquecido com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 40 μ g/ml de gentamicina (HC-USP, SP,

Brasil), 20µg/ml de cefalosporina (Peflacin®, Rhodia, SP, Brasil) e 10% de soro fetal bovino inativado. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, e a viabilidade com vital Azul de Tripán (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA).

As PBMC foram congeladas, conforme método já descrito anteriormente, em tubos contendo 40×10^6 células/ml, e utilizadas como respondedoras em todas as co-culturas. Ao serem descongeladas, apenas as células com viabilidade maior do que 85% foram utilizadas nos ensaios de cocultivo que serão descritos mais adiante.

3.8 Marcação de PBMC com CFSE

Para os ensaios de proliferação celular induzida pelo anti-CD3 e avaliação do efeito supressor das AdMSC, marcamos as PBMC com CFSE, (do inglês, *carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester, Succinil, Ester*) (Molecular Probes, Eugene, OR), e avaliamos por citometria de fluxo. O CFSE difunde passivamente para dentro das células e somente após a clivagem de seu grupo acetato pelas esterases intracelulares e a reação do radical livre succidinimil éster com as aminas intracelulares é que a fluorescência é liberada. Esse conjugado fluorescente permanece nas células durante seu desenvolvimento e mitose. As células (10^7 cells/ml) foram, então, ressuspendidas em PBS e incubadas a 37°C, por 10 minutos, com CFSE a uma concentração de 2,5µM. O processo de marcação foi bloqueado adicionando-se meio de cultura RPMI (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) gelado contendo 10% de SBFi, e deixando-as por 5 minutos no gelo. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em meio

de cultura contendo 10% de SBFi. Essas células marcadas foram utilizadas para realizar os ensaios funcionais de inibição da proliferação das PBMC estimuladas com anti-CD3 (OKT3, Janssen-Cilag BV, Tilburg, The Netherlands) e cultivadas com as AdMSC, conforme será descrito no próximo item.

3.9 Cocultivo de AdMSC e PBMC para ensaios funcionais

3.9.1 Ensaio para avaliar efeito das AdMSC na proliferação celular de LT

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito das AdMSC sobre a proliferação de PBMC, e produção de citocinas, frente a um estímulo policlonal, anti-CD3 (OKT3, Janssen-Cilag BV, Tilburg, The Netherlands). As condições utilizadas foram as seguintes:

- 1. PBMC**
- 2. PBMC * (marcada com CFSE)**
- 3. PBMC*+anti-CD3**
- 4. PBMC*+anti-CD3 + AdMSC (em diferentes concentrações)**

Utilizamos 5 concentrações diferentes de AdMSC para avaliar se a supressão da proliferação dos linfócitos T era dose dependente. Sendo assim, as proporções utilizadas de MSC: PBMC foram de 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 e 1:100.

As condições foram montadas em triplicatas em placas de 24 poços. As AdMSC foram plaqueadas em 1ml de meio AphaMEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% SBFi (Hyclone, South, Logan, UT, USA conforme proporção estudada (2×10^6 , $0,4 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$, $0,04 \times 10^6$, $0,02 \times 10^6$),

24 horas antes das PBMC para que aderissem à placa. Posteriormente, utilizamos 2×10^6 de PBMC previamente marcadas com CFSE, como descrito na seção anterior, mantidas em 1ml de meio RPMI (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) completo com 10% de SBFi (Hyclone, South, Logan, UT, USA); este cocultivo ficou em estufa úmida com 5% de CO_2 , por 5 dias.

O sobrenadante foi coletado nos dias 1, 3 e 5, e imediatamente congelado a -80°C , onde permaneceu até o momento da realização da dosagem das citocinas. As células marcadas com CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) foram coletadas (as triplicatas foram juntadas) centrifugadas a 600g por 8 minutos e lavadas com PBS, para assim, serem marcadas com o anticorpo anti-CD3PECy5 (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). A marcação com este anticorpo foi realizada após fixação e permeabilização das células com o Kit *Cytofix/Cytoperm* (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Este protocolo foi realizado uma vez que há competição entre o anticorpo solúvel usado em cultura e o anticorpo usado na citometria, não mostrando nenhuma marcação para CD3 com o protocolo usual de marcação de superfície. A compensação ótima de cada experimento foi determinada a partir das células não marcadas e daquelas marcadas individualmente com anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos.

Para as análises posteriores, sempre procuraremos associar nossos outros resultados a este ensaio funcional de efeito das AdMSC sobre a proliferação dos LT.

3.9.1.1 *Análise da proliferação celular por FACs*

Após realizarmos a marcação com anti-CD3 PE-CY5 , 30.000 eventos foram adquiridos para cada amostra, selecionados na região de linfócitos, no citômetro FacScalibur (BD, Becton, Dickinson and Company,NJ,EUA). No ensaio de proliferação com CFSE observa-se diminuição da intensidade de fluorescência conforme ocorre divisão celular, e o número de células que proliferaram é contado dentro das células CD3⁺ na região CFSE^{low}, conforme exemplificado na **(Figura 5)**. Somente consideramos válidos aqueles experimentos cujo índice de estimulação (%CFSE^{low}PBMC estimuladas/%CFSE^{low}PBMC não estimuladas) foi maior do que 2. Para verificarmos a porcentagem de inibição da proliferação após o contato com as AdMSC usamos o seguinte cálculo:

$$\left[\frac{(\%CFSE^{low}PBMC \text{ estimuladas} - \%CFSE^{low}PBMC_{estimadas+AdMSC})}{\%CFSE^{low}PBMC \text{ estimuladas}} \right] * 100.$$

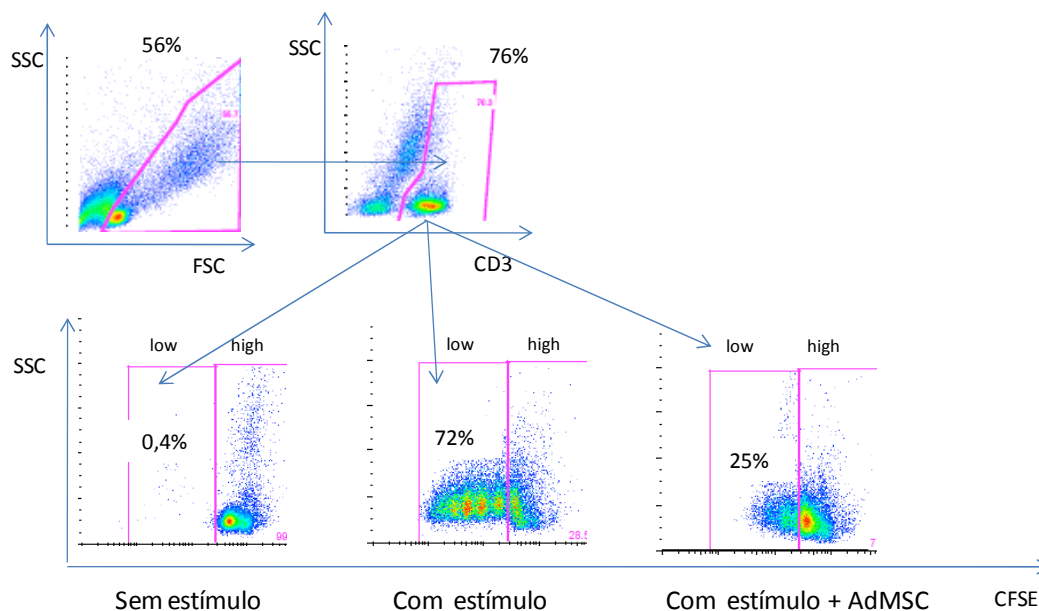


Figura 5 – Estratégia de análise da proliferação com marcação CFSE. Foram adquiridos 30.000 eventos na região R1 de linfócitos, delimitada por FSC x SSC, e o experimento foi validado se o índice de estimulação (IE) era maior do que 2,0. Esse índice foi calculado $\% \text{ células CFSE}^{\text{low}} \text{ PBMC estimuladas} / \% \text{ células CFSE}^{\text{low}} \text{ PBMC não estimuladas}$. Apresentamos as condições células PBMC marcadas com CFSE, mas sem estímulo com anti-CD3; com o estímulo; com o estímulo e após contato com as AdMSC.

3.9.2 Avaliação do efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão celular de proteínas da resposta imune e em diferentes subpopulações de linfócitos T – FACS

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar se a interação com as AdMSC induziu alguma modulação da expressão de proteínas relacionadas à resposta imune, presentes tanto nas AdMSC quanto nas PBMC. Utilizamos placas de 6W. Plaqueamos $0,3 \times 10^6$ de AdMSC e deixamos em 1ml de meio Alpha MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de SBFi por 24 horas na estufa úmida a 37°C e 5% CO_2 para que as AdMSC aderissem. No dia seguinte, descongelamos as PBMC (Pe5) e plaqueamos

3×10^6 sobre as AdMSC, mantendo a proporção 1:10. Em 4ml de meio RPMI acrescido de 10ml de SBFi (Hyclone, South, Logan, UT, USA).

As condições plaqueadas foram:

- 1. PBMC + anti-CD3**
- 2. PBMC +anti-CD3 +AdMSC**
- 3. AdMSC + anti-CD3**

Após 3 dias de cultura dos ensaios de cocultivo de PBMC e AdMSC, avaliamos as subpopulações de células ativadas e de células T reguladoras e algumas moléculas da resposta imune (Tabela 2). Para isso usamos os seguintes anticorpos: CD90 FITC, CD90 APC, HLADR PE-Cy5, CD80 PE, CD86 FITC, PDL1 PE, CXCL10 PE, CD105 PE-Cy5, CD73 APC, CXCR3 PE-Cy5, CD25 FITC, CD4APC, CD4 PE-Cy5, CCR5 PE-Cy5, CCR4 PE-Cy7, CCR7 PE-Cy7, CD8 FITC, ICOS PE, OX40 PE-Cy5 (todos da BD, Becton Dickinson and Company, NJ, EUA), FOXP3 PE (eBioscience, San Diego, CA, USA), CCL5 APC (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), LAP PE (Biosource, Camarillo, CA).

Tabela 2- Painel de proteínas avaliadas nos LT e nas AdMSC por Citometria de Fluxo

Célula avaliada	Fenótipo	Função
AdMSC	CD90 ⁺ LAP ⁺	Imunorregulação
	CD90 ⁺ PDL1 ⁺	Imunorregulação
	CD90 ⁺ HLADR ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁺	Ativação
	CD90 ⁺ CXCL10 ⁺ CCL5 ⁺	Quimioatração Treg
LT	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD73 ⁺	Treg - adenosina
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CXCR3 ⁺	Treg Th1
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR4 ⁺ CCR5 ⁺	Treg Tx
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR7 ⁺	Treg linfonodo
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ ICOS ⁺ OX40 ⁺	Ativação

As moléculas acima descritas foram avaliadas nas AdMSC cultivadas sozinhas com anti-CD3, assim como nas PBMC com anti-CD3, e em ambas populações após o cocultivo, após 3 dias.

As amostras foram adquiridas (300.000 eventos) no citômetro de fluxo FASCanto, (BD, Becton Dickinson and Company, NJ, EUA) utilizando-se o programa BD FACSDiva Software (Becton & Dickinson Immunocytometry Systems, NJ, EUA), e analisadas no programa FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR). Utilizamos a estratégia de análise das (**Figuras 6, 7 e 8**) para cada subpopulação em estudo.

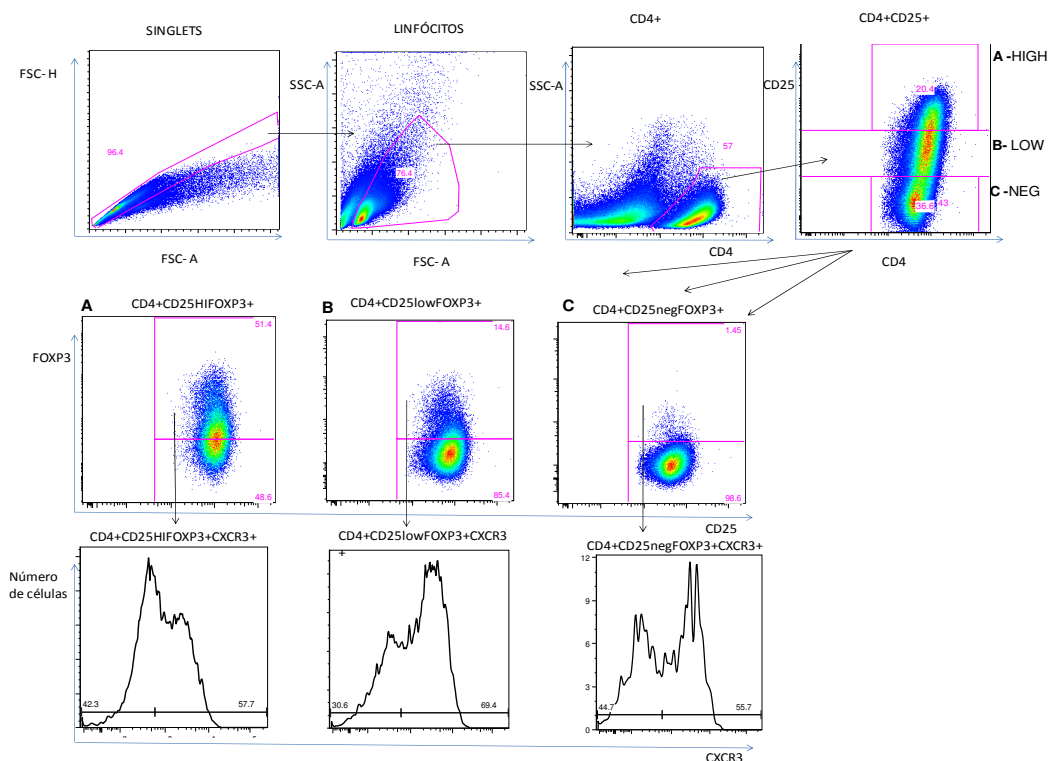


Figura 6 – Estratégia de análise das subpopulações de células Treguladoras. Foram adquiridos 300.000 eventos na região de linfócitos determinado por SSC-A x FCS-A. Para análise inicialmente selecionamos as células únicas, pela região em “singlets”; posteriormente delimitamos a região dos linfócitos; desta selecionamos as células CD4+; desta as CD25 diferenciadas em CD25HI (alta expressão do fluorocromo) CD25low (baixa expressão do fluorocromo) e CD25neg (expressão negativa do fluorocromo). Em cada uma dessas populações analisamos a porcentagem de positividade para FOXP3. Somente dentro das FOXP3+ analisamos o número de células positivas para CXCR3 (apresentada no gráfico), bem como CCR7, e as duplo positivas para CCR4 e CCR5. Além da porcentagem de positividade avaliamos também a mediana de intensidade de fluorescência. Para a análise de CD73+ fizemos uma região nas células CD3+ antes das CD4+.

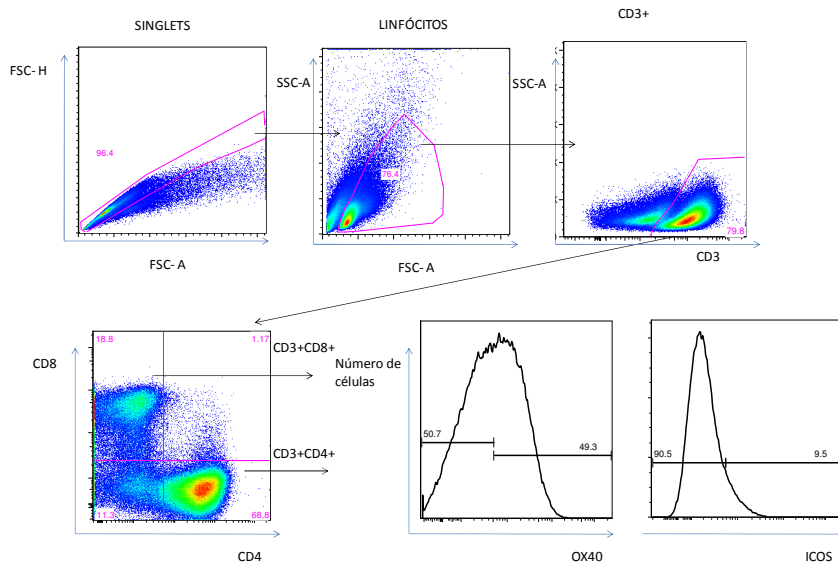


Figura 7 – Estratégia de análise de células T ativadas. Foram adquiridos 300.000 eventos na região de linfócitos determinada por SSC-A x FCS-A. Para análise inicialmente selecionamos as células únicas, pela região em “singlets”; posteriormente delimitamos a região dos linfócitos; desta selecionamos as células CD3+; desta as CD4+ e CD8+. Em cada uma dessas populações analisamos a porcentagem de positividade para ICOS e OX40. Além da porcentagem de positividade avaliamos também a mediana de intensidade de fluorescência.

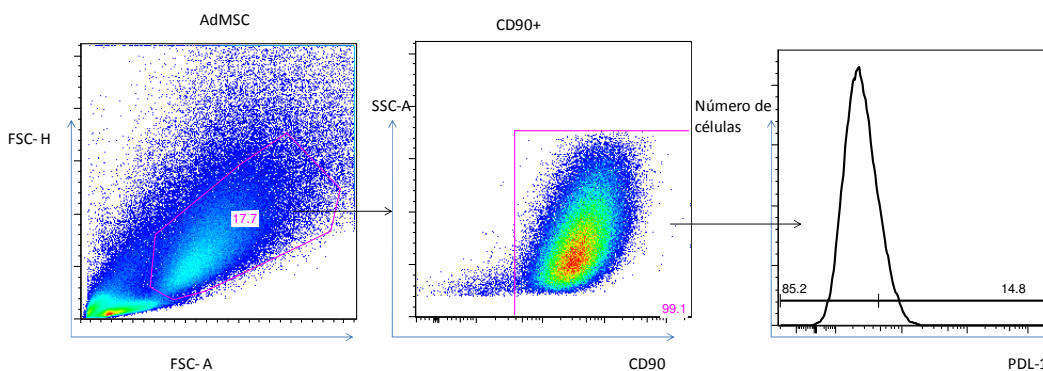


Figura 8- Estratégia de análise AdMSC. Foram adquiridos 300.000 eventos na região das AdMSC determinada por SSC-A x FCS-A. Para análise inicialmente selecionamos as células CD90+; desta as PDL-1 positivas. Além da porcentagem de positividade avaliamos também a mediana de intensidade de fluorescência. Fizemos a mesma análise para as outras moléculas avaliadas: CD80, CD86, HLADR, LAP e para as células duplo positivas para CXCL10 e CCL5.

3.9.3 Ensaio para avaliar efeito da interação AdMSC/PBMC na produção de citocinas nos sobrenadantes da co-culturas

Avaliamos a produção de citocinas no sobrenadante da cultura do cocultivo utilizado no ensaio de proliferação (item 4.8.1) correspondente a cada condição de período estudado, nos primeiro, terceiro e quinto dias. Dosamos as citocinas IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-2. Para o ensaio utilizamos o teste comercial “Cytometric Bead Array (CBA Th1/Th2)”, (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Neste método, 50 μ l de uma mistura de 6 tipos de microesferas com intensidade distintas de fluorescência e recobertas com anticorpos específicos para cada citocina foram adicionados para cada tubo de amostra e da curva-padrão. Em paralelo, foi preparada a curva-padrão com uma mistura das 6 citocinas com concentrações conhecidas. A seguir, foram adicionados 50 μ l de uma mistura de anticorpos anti-citocinas marcados com ficoeritrina (PE) a cada tubo de amostra e da curva-padrão. Por último, adicionamos 50 μ l das amostras e da curva, adicionamos 1 ml de tampão de lavagem a cada tubo e centrifugamos a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi, então, descartado e as esferas foram ressuspensas em 300 μ l de tampão de lavagem. Em seguida, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo *FASCanto II*, (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA) utilizando-se o programa BD FACS DIVA™ Software no BD CBA Software (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Para a análise, foi realizado um ajuste do aparelho com esferas-padrão marcadas com fluoresceína (FITC) e PE (Ficoeritrina). Foram adquiridas e analisadas 5.000 esferas por amostra. A análise da concentração das citocinas de cada

amostra foi calculada a partir da curva-padrão de cada citocina. (FCAP Array Software BD- Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Foram considerados positivos todos os valores entre os limites de detecção do teste (5 - 5000 pg/ml) para cada citocina. Quando as amostras apresentaram concentração abaixo do limite inferior da curva padrão, consideramos o valor logo abaixo do limite de detecção para aquela determinada amostra (por exemplo, 4,9 pg/ml para o limite de 5,0 pg/ml), para o cálculo de produção induzida.

3.9.4 *Ensaio para avaliar o efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão gênica de um painel de moléculas da resposta imune – Real time PCR*

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar se após a interação AdMSC/PBMC houve modulação da expressão de genes relacionados à resposta imune, presentes tanto nas AdMSC quanto nos LT. Utilizando placas de 6W plaqueamos $0,25 \times 10^6$ de AdMSC e deixamos em 1ml de meio Alpha MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de SBFi por 24 horas na estufa úmida a 37°C e 5% CO₂ para que aderissem. No dia seguinte, descongelamos as PBMC (Pe4) e plaqueamos $2,5 \times 10^6$ sobre as AdMSC, mantendo a proporção 1:10 em 4ml de meio RPMI acrescido de 10ml de SBFi (Hyclone, South, Logan, UT, USA)

As condições plaqueadas foram:

- 1. PBMC + anti-CD3**
- 2. PBMC +anti-CD3 +AdMSC**
- 3. AdMSC + anti-CD3**

Após 3 dias de cocultivo de PBMC e AdMSC, realizamos a purificação dos LT das 2 condições e a purificação das AdMSC da condição do cocultivo, que será especificada na próxima seção, para posterior extração de RNA e análise da expressão gênica

3.9.4.1 Separação das células após o cocultivo para extração de RNA

A partir das condições iniciais de cultivo citadas anteriormente, separamos os LT e as AdMSC utilizando esferas magnéticas (Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany).

Da condição do cocultivo, primeiramente coletamos as PBMC que estavam em suspensão, lavamos as AdMSC aderidas com DPBS (Gibco, Rockville, MD, USA), sempre coletando o lavado para não perder células e soltamos as células mesenquimais usando Tryple Select (Gibco, Rockville, MD, USA), um reagente similar à tripsina, mas menos agressivo às células; utilizamos o mesmo protocolo citado anteriormente. Juntamos todas as células e centrifugamos a 600g por 10min. Lavamos mais uma vez com DPBS e marcamos primeiramente, todas as células com as esferas do kit PanT (Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany). Dessa forma, obtivemos as células T e as AdMSC por um sistema de isolamento indireto, seleção negativa. Esse kit possui esferas magnéticas biotiniladas conjugadas aos anticorpos: CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, and CD235a (glycophorin A), de forma que células não T, como os monócitos, NK, células B, eritrócitos, granulócitos e células dendríticas, ficam retidas na coluna, e as células T e as AdMSC que não possuem nenhuma das moléculas acima, são

selecionadas negativamente. Posteriormente, essas células foram incubadas simultaneamente com esferas do Kit CD4+ (Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany) e CD8+(Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany), selecionando positivamente os LT, e indiretamente as AdMSC Com essa estratégia obtivemos uma população de células mais puras de LT e de AdMSC. Optamos por usar a seleção negativa por PanT (Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany), uma vez que as células em cultura foram estimuladas com anti-CD3 (OKT3, Janssen-Cilag BV, Tilburg, The Netherlands) e as esferas de seleção positiva para células CD3+ não grudam nas células T, mesmo sendo anticorpos monoclonais originários de clones diferentes.

Realizamos todo o protocolo em gelo e, para minimizarmos a morte celular, utilizamos um meio chamado Hibernate A (Gibco, Rockville, MD, USA), suplementado com 10% SBFi a cada lavagem da célula em que o uso do meio de cultura não prejudicasse o procedimento (após a tripsinização, para contagem celular, após a separação celular). Logo após o fim do procedimento, contamos as células, e quando possível, uma alíquota foi separada para verificarmos a pureza e viabilidade das células, por citometria de fluxo. As amostras foram centrifugadas mais uma vez e ressuspendidas em RNAprotect® Cell Reagent (Qiagen, AMBION, Inc, Austin, Texas, USA) armazenadas no freezer -80°C para posterior extração do RNA.

Na etapa de verificação da pureza, utilizamos marcação direta com anticorpos CD4+ e CD8+ para verificarmos a pureza dos LT, e anticorpo CD90 para verificarmos a pureza das AdMSC, e iodeto de propídeo para verificarmos morte celular.

3.9.4.2 Extração de RNA

Para cada experimento, processamos as amostras armazenadas em RNAprotect® Cell Reagent (Qiagen, AMBION, Inc, Austin, Texas, USA) nas seguintes condições:

- 1. LT purificados das PBMC (cultivadas sem o contato das AdMSC)**
- 2. LT purificados do cocultivo (PBMC cultivadas com o contato com as AdMSC)**
- 3. AdMSC sozinhas (cultivadas sem o contato com as PBMC)**
- 4. AdMSC purificadas do cocultivo (cultivadas com o contato das PBMC)**

Realizamos a extração de RNA utilizando o kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen, AMBION, Inc, Austin, Texas, EUA), conforme especificações do fabricante (**Figura 9**). De forma bem simplificada, as células foram lisadas e homogeneizadas e, posteriormente, passadas em uma coluna específica para eliminação do DNA genômico. Após a adição de álcool o RNA fica retido em outra coluna para, assim, ser eluído e quantificado.

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, Fullerton, CA, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. Sendo considerada uma boa pureza aquela que apresentou valores de razão entre 1,8 a 2,0. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a

1 corresponde a 40 µg de RNA/ ml no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook & Russel, 2001). Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose RNase free 1% para visualização da integridade do RNA, observando-se as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA, com a presença de um arraste no gel, ou mesmo acúmulo de material genômico no poço.

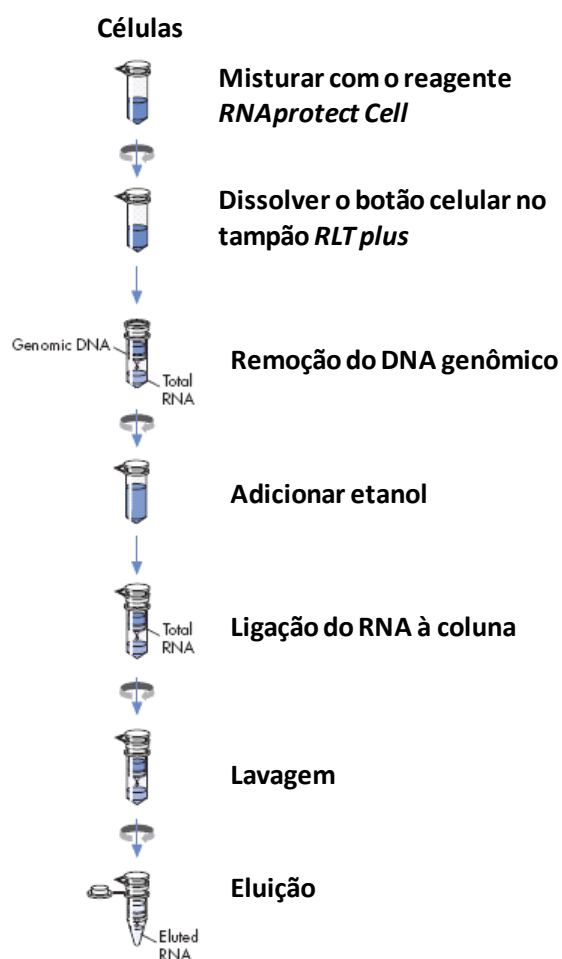


Figura 9- Representação da extração de RNA pelo RNeasy Protect Cell Mini Kit, retirado do protocolo do produto

3.9.4.3 *Transcrição Reversa para Obtenção do cDNA*

Foi utilizado o Kit comercial (RT² First Strand Kit, SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA) para a obtenção do cDNA. O protocolo foi seguido de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, 3 µg de RNA total, acrescidos de 2 µl do tampão para eliminação de DNA genômico e água estéril q.s.p. 10 µl, foram incubados a 42°C por 5 minutos, de forma a remover as estruturas secundárias, e colocadas imediatamente em gelo por pelo menos 1 minuto. Logo após, foi adicionado o segundo coquetel que contém o iniciador Random hexâmeros e oligodT, um controle externo da reação e a transcriptase reversa, em um volume final de 10µl. Esta mistura foi colocada novamente no termociclador a 42°C por 15 minutos e a 95°C por 5 minutos, para promover a desnaturação de estruturas híbridas (cDNA-RNA). Ao final foram adicionados mais 91µl de H₂O a cada tubo, e as amostras armazenadas a -20°C.

Como controle da reação de transcrição, realizamos uma reação de PCR para todas amostras, para o gene de controle interno HPRT. Esta enzima HPRT (*HPRT*, do inglês, "*hypoxanthina phosphoribosyl transferase*") tem papel importante na síntese de nucleotídeos e está presente ubiquitariamente nas células, tendo sido utilizada como controle da reação de transcrição do RNA em cDNA. Assim, utilizamos 1µl do cDNA transcrito, 2 µl do tampão 1x para PCR (200 mM Tris-HCl e 500 mM KCl) (Invitrogen CA, USA); MgCl₂ 1,5mM (Invitrogen CA, USA); dNTP 250 µM (Invitrogen CA, USA); primers 5' e 3' a 0,3 µM (ver sequência **tabela 3**) (Invitrogen CA, USA); e Taq polimerase 1U (Invitrogen CA,USA). Esta reação foi processada em termociclador por 30 ciclos que compreendem: desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de

anelamento a 58°C por 30 segundos e uma extensão a 72°C por 1 minuto, completados por uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto desta reação foi carregado em gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) e submetido à corrida eletroforética a 100 V, durante 40 minutos.

Tabela 3: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de PCR para HPRT

"Primers"	Sequência em nucleotídeos
HPRT 5'	5' CCT GCT GGA TTA CAT CAA AGC ACT G 3'
HPRT 3'	5' AGG ACC CCA CGA AGT GTT GGA 3'

3.9.4.4 Escolha e validação dos primers

Os genes foram por nós escolhidos, sendo 30 para serem avaliados nas AdMSC e 30 nos LT separadamente, além de 2 genes de controle endógeno (GAPDH e ACTB). Há genes com caráter imunorregulador, proinflamatório, de ativação, diferenciação e morte celular (**Figura 10 e 11**). No entanto, o desenho e síntese dos primers (iniciadores) utilizados nas reações de amplificação foram realizados pela SABiosciences (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA) de forma a permanecerem em dois exons distintos para evitar a amplificação errônea de DNA genômico no lugar do cDNA.

A especificidade dos primers foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação de PCR em tempo real, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto.

A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois na medida em que as pontes de hidrogênio, que mantêm as duplas fitas unidas, se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR-Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura, significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento (T_m) do produto de amplificação (amplicon).

3.9.4.5 *Análise da expressão de fatores de transcrição por qRT-PCR (PCR em tempo real)*

O cDNA obtido pela técnica acima foi utilizado como molde para a reação de amplificação para esta etapa. Foi utilizada também uma solução comercial que contém todos os reagentes necessários para a reação de PCR (RT Master Mix contendo SYBR Green, SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA), além de iniciadores específicos para cada gene a ser estudado, em triplicata. O sistema usado será o RT² Profiler PCR Array customizado (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA). Assim, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, sendo uma placa para cada tipo celular (AdMSC e LT), e o equipamento para corrida “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI

PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn+ - Rn-$), onde $Rn+$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e $Rn-$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre o acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn , que seria uma linha de corte (Threshold) para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o threshold corresponde ao Ct (cycle threshold) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. Foi realizada uma análise usando-se o ΔCt para uma comparação entre as condições com e sem AdMSC (para os LT) e com e sem PBMC (para as AdMSC). Nesse caso, quanto menor o valor, maior a expressão do RNAm. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi realizado utilizando-se como gene de referência o GAPDH, e a seguinte fórmula:

$2^{\Delta\Delta Ct}$ ou $2^{\Delta Ct}$ ou $2^{((Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno})_{\text{pós cocultivo}} - (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno})_{\text{pura}})}$. Consideramos significativo todo o valor de $QR \geq 2$ (expressão relativa aumentada) ou $QR \leq 0,5$ (expressão relativa diminuída).

Após a corrida (*thermal cycler protocol I*- amplificação), a placa foi submetida ao *thermal cycler protocol II* para a obtenção das curvas de dissociação.

Os dados foram analisados com o auxílio do software ABI Prism 7700 Detection Systems Software – v1.6.4.

3.9.4.6 Critérios de validação das reações de PCR em tempo real

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: (i) presença de controles brancos adequados, sem amplificação ou considerada indetectável, (ii) curva de amplificação com padrão exponencial e platô, e com o seu início de aumento antes de CT de 30, (iii) curva de dissociação adequada com pico único, (iv) ocorrência de amplificação do gene de interesse com CT de até 35, (v) triplicatas do ensaio com diferenças entre elas < 1 CT. Nos casos em que uma das triplicatas não atendeu os critérios de validação, ela foi excluída e as análises realizadas com as médias dos outros dois Cts, desde que dentro dos critérios de validação.

3.9.4.7 Classificação das alterações de expressão gênica

Para facilitar a análise das modificações de expressão gênica, classificamos os genes analisados em predominantemente **imunorreguladores** ou **proinflamatórios**. De acordo com o valor da quantificação relativa ($QR \geq 2$ expressão relativa aumentada ou $QR \leq 0,5$ expressão relativa diminuída) classificamos as modificações de expressão gênica como sendo REGULA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente imunorreguladoras ou diminuição da expressão de moléculas próinflamatórias) e INFLAMA (aumento da expressão relativa de

moléculas predominantemente próinflamatórias ou diminuição da expressão de moléculas imunorreguladoras). Também, inicialmente classificamos qualitativamente as alterações de expressão gênica quando não pudemos calcular a QR (amostra da co-cultura ou da condição sem contato Ct indetectável ou Ct >35). As alterações qualitativas foram então inicialmente classificadas como indução (quando na amostra da condição da co-cultura o Ct foi <35 e no na amostra da condição sem contato, o Ct foi >35). No entanto, para posteriormente quantificarmos essa indução, utilizamos a seguinte estratégia: quando o Ct da amostra da condição sem contato foi indetectável ou mesmo quando o valor determinado foi maior que 35, substituímos os Ct por 35 (que é o valor limite máximo considerado de expressão gênica, pelos critérios de validação). Esta estratégia foi obtida do próprio programa de análise fornecida pela SABiosciences.

3.9.5 Testes estatísticos

Para a análise da produção de citocinas na presença das AdMSC utilizamos o teste t Mann Whitney além de realizar também o teste t pareado Wilcoxon. Para analisar a inibição da proliferação bem como a modulação das subpopulações celulares entre as condições com e sem AdMSC utilizamos o teste pareado t pareado Wilcoxon, do programa Prism 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

Realizamos a análises de correlação da produção de citocinas do sobrenadante das co-culturas, bem como de expressão de mRNA nas AdMSC e nos LT entre os ensaios de maior e menor supressão da proliferação utilizando o teste de correlação de Spermán, do programa STATA 10.0.

Classificação Predominante	Símbolo Gene	Nome inteiro	Alias	Refsequece NCBI	Número do Catálogo RT2
IMUNORREGULADOR	S1PR1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	CHEDG1/D1S3362/ECGF1/EDG-1/ EDG1/ FLJ58121/ S1P1	NM_001400	PPH01350
	IL9	Interleukin 9	HP40/IL-9/P40	NM_000590	PPH00693
	IL4	Interleukin 4	BCGF-1/BCGF1/BSF1/IL-4/MGC79402	NM_000589	PPH00565
	NFATC2	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	NFAT1/NFATP	NM_012340	PPH01471
	IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	CD107B/IDO/INDO	NM_002164	PPH01328
	TLR10	Toll-like receptor 10	CD290/MGC104967/MGC126398/MGC126399	NM_030956	PPH01794
	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	NM_000633	PPH00079
	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1/TGFB/TGFbeta	NM_000660	PPH00508
	IL10	Interleukin 10	CSIF/L-10/ MGC126450/ MGC126451 /TGIF	NM_000572	PPH00572
	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	MGC35334/PRVTIRB/TICAM-1/TRIF	NM_182919	PPH06044
	FOXP3	Forkhead box P3	AID/DIETER/IPEX/JM2/MGC141961/MGC141963/PDX/XPID CDw198/CKR.L1/ CKRL1/	NM_014009	PPH00029
	CCR8	Chemokine (C-C motif) receptor 8	CMKBR8/ CMKBRL2/CY6/GPR-CY6/ MGC129966/ MGC129973/TER1	NM_005201	PPH00618
	LRRC32	Leucine rich repeat containing 32	D11S833E/GARP	NM_005512	PPH12836
	GATA3	GATA binding protein 3	HDR/MGC2346/MGC5199/MGC5445	NM_002051	PPH02143
	SOC3S	Suppressor of cytokine signaling 3	ATOD4/CIS3/Cish3/MGC71791/S OCS-3/SSI-3/SSI3	NM_003955	PPH00763
	HLA-G	Major histocompatibility complex, class I, G	MHC-G	NM_002127	PPH23053
	IL13	Interleukin 13	ALRH/BHR1/IL-13/ MGC116786/ MGC116788/MGC116789/P600	NM_002188	PPH00688
	CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	CD152/CELIAC3/CTLA-4/GSE/IDDM12	NM_005214	PPH00834
	LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1	DKFZp686E23103/GAL1/GBP	NM_002305	PPH19360
	CTNBN1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNBN/DKFZp686D02253/FLJ25606/FLJ37923	NM_001904	PPH00643
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	CC-CKR-4/ CD194/ CKR4/ CMKBR4 /ChemR13/HGCN:14099/K5-5/MGC88293	NM_005508	PPH00614	
PRÓ-INFLAMATÓRIO	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha/TNFA/TNFSF2	NM_000594	PPH00341
	TBX21	T-box 21	T-PET/T-bet/TBET/TBLYM	NM_013351	PPH00396
	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI	NM_000619	PPH00380
	RUNX3	Runt-related transcription factor 3	AML2/CBFA3/FLJ34510/MGC16070/PEBP2aC	NM_004350	PPH13428
	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA/IL1F2	NM_000576	PPH00171
	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	CD121b/IL1RB/MGC47725	NM_004633	PPH00313
	RORC	RAR-related orphan receptor C	MGC129539/NR1F3/RORG/RZR-GAMMA/RZR/TOR	NM_005060	PPH05877
OUTROS	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV)	CLG4B/GELB/MMP-9	NM_004994	PPH00152
	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A/MMP-II/MONA/TBE-1	NM_004530	PPH00151
ENDÓGENO	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD/MGC88685	NM_002046	PPH00150
	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1	NM_001101	PPH00073

Figura 10 - Genes selecionados para o Super Array- Genes selecionados para serem analisados nos Linfócitos T. Os genes foram classificados de acordo com sua função predominante.

Classificação Predominante	Símbolo Gene	Nome inteiro	Alias	Refsequence NCBI	Número do Catálogo RT2
IMUNORREGULADOR	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	F-TCF/HGFB/HPTA/SF	NM_000601	PPH00163
	IL13	Interleukin 13	ALRH/BHR1/IL-13/ MGC116786/ MGC116788/MGC116789/P600	NM_002188	PPH00688
	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/ HC11/ HSMCR30/ MCAF/MCP-1/ MCP1/ MGC9434/ SCYA2/SMC-CF	NM_002982	PPH00192
	IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	CD107B/IDO/INDO	NM_002164	PPH01328
	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	HEP-NOS/INOS/NOS/NOS2A	NM_000625	PPH00173
	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	MGC70609/MVCD1/VEGF/VEGF-A/VPF	NM_003376	PPH00251
	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1/TGFB/TGFBeta	NM_000660	PPH00508
	NRP1	Neuropilin 1	BCCA4/CD304/DFKZp686A03134 /DKFZp781F1414/NP1/NRP/VEGF165R	NM_003873	PPH01152
	CD274	CD274 molecule	B7-H/ B7H1 /MGC142294 /MGC142296/ PD-L1/PDCD1L1/PDCD1LG1/PDL1	NM_014143	PPH21094
	IL4	Interleukin 4	BCGF-1/BCGF1/BSF1/IL-4/MGC79402	NM_000589	PPH00565
	LIF	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	CDF/DIA/HILDA	NM_002309	PPH00813
	CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	I309/P500/SCYA1/SISe/TCA3	NM_002981	PPH00701
	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF-1alpha/HIF1/HIF1-ALPHA /MOP1/PASD8/bHLHe78	NM_001530	PPH01361
	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	APT1LG1/CD178/CD95L/FASLT/NFSF6	NM_000639	PPH00142
	CCL22	Chemokine (C-C motif) ligand 22	A-152E5.1/ABCD-1/DCB-CK/MDC/MGC34554/SCYA22/STCP-1	NM_002990	PPH00697
	HLA-G	Major histocompatibility complex, class I, G	MHC-G	NM_002127	PPH23053
	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	CD106/DFKZp779G2333/INCAM-100/MGC99561	NM_001078	PPH00623
	FOXP3	Forkhead box P3	AIID/DIETER/IPEX/JM2/MGC141961/MGC141963/PIDX/XPID	NM_014009	PPH00029
	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX2; COX-2; PHS-2; PGG/HS; PGHS-2; hCox-2; GRIPGHS; PTGS2	NM_000963.2	PPH01136
IL10	Interleukin 10	CSIF/IL-10/ IL10A/ MGC126450/ MGC126451/TGIF	NM_000572	PPH00572	
CCL17	Chemokine (C-C motif) ligand 17	A-152E5.3/ABCD-2/ MGC138271/ MGC138273/SCYA17/TARC	NM_002987	PPH00543	
PRÓ-INFLAMATÓRIO	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha/TNFA/TNFSF2	NM_000594	PPH00341
	IL17A	Interleukin 17A	CTLA8/IL-17/IL-17A/IL17	NM_002190	PPH00537
	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI	NM_000619	PPH00380
	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	CLMF/CLMF2/IL-12B/NKSF/NKSF2	NM_002187	PPH00545
	RUNX3	Runt-related transcription factor 3	AML2/CBFA3/FLJ34510/MGC16070/PEBP2aC	NM_004350	PPH13428
	SEMA4D	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	C9orf164/CD100/FLJ33485/FLJ34282/FLJ39737/FLJ46484/M-sema-G/ MGC169138/ MGC169141/SEMAJ/coll-4	NM_006378	PPH22884
OUTROS	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB/MMP-9	NM_004994	PPH00152
	THY1	Thy-1 cell surface antigen	CD90/FLJ33325	NM_006288	PPH02406
	POU5F1	POU class 5 homeobox 1	MGC22487/OCT3/OCT4/OTF3/OTF4	NM_002701	PPH02394
ENDÓGENO	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD/MGC88685	NM_002046	PPH00150
	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1	NM_001101	PPH00073

Figura 11. Genes selecionados para o Super Array- Genes selecionados para serem analisados nas AdMSC. Os genes foram classificados de acordo com sua função predominante.

Resultados

4. Resultados

4.1 Caracterização morfológica e imunofenotípica das AdMSC

Realizamos a caracterização imunofenotípica das células mesenquimais de origem adiposa (AdMSC), derivadas de 10 indivíduos, entre a a passagem 4 (P4) e 6 (P6). Apenas uma célula, a AdMSC6, que foi utilizada nos outros experimentos desta dissertação, totalizando 11 AdMSC, não foi caracterizada imunofenotipicamente por questões técnicas. Os experimentos foram realizados por citometria de fluxo. Os marcadores proteicos utilizados não são exclusivos para as AdMSC, mas em conjunto com outras características que as definem, compõem um painel necessário para caracterizá-las.

As AdMSC expressaram os marcadores CD90, CD13, CD73, CD49e, CD29, CD44, e não expressaram os marcadores hematopoiéticos como CD34 e CD45, assim como os marcadores CD51/61 (marcadores de plaquetas), CD14 (monócitos), CD31 (monócitos, células endoteliais), CD133 (precursores hematopoiéticos) e HLADR (**Tabelas 4 e 5**). De forma geral, a análise de porcentagem de positividade (**Figura 13**) foi mais homogênea do que pelas medianas de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês, *median fluorescence intensity* (**Figura 14**)). No entanto, para algumas moléculas, observamos uma variação tanto quanto à mediana de intensidade de fluorescência quanto à porcentagem de positividade: para as moléculas de adesão CD44 (variação de MFI, de 56 a 375, e de 8 a 49 % de positividade), e CD49e (variação MFI de 23 a 108; e de 47 a 97% de positividade). Observamos uma expressão

heterogênea de HLA-ABC (variação MFI 10 a 68; e de 0,7 a 54 % de positividade) em 6 das 10 células estudadas para essa molécula.

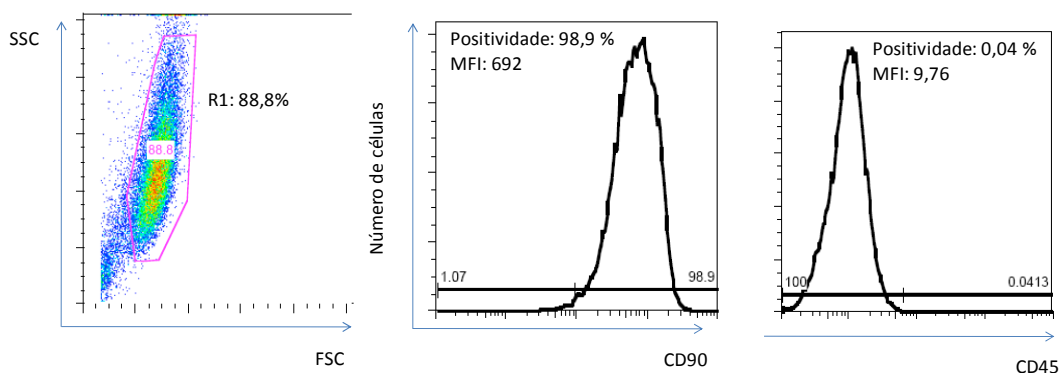


Figura 12 – Exemplo de análise da imunofenotipagem das AdMSC. Foram adquiridos 20.000 eventos na região R1 mostrado no gráfico de tamanho por granulosidade (FCSxSSC). Cada fluorescência foi analisada individualmente por histograma, tanto pela porcentagem de positividade quanto para mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Acima, nos histogramas está exemplificado da esquerda para direita, uma marcação positiva (CD90) e uma marcação negativa (CD45).

Tabela 4- Caracterização imunofenotípica das AdMSC: Porcentagem de positividade

Molécula	AdMSC2	AdMSC4	AdMSC5	AdMSC7	AdMSC9	AdMSC10	AdMSC11	AdMSC12	AdMSC13	AdMSC14	Mediana
Passagem	P4	P4	P4	P4	P5	P4	P4	P4	P4	P6	
CD14	0,21	0,07	0,82	0,04	0,19	0,24	0,06	0,05	0,00	0,08	0,08
CD31	2,66	0,02	0,66	0,01	0,07	0,03	0,04	0,03	0,08	0,10	0,05
CD34	0,09	0,06	0,12	0,07	0,14	0,19	0,23	0,16	0,85	0,42	0,15
CD45	0,06	0,08	0,11	0,08	0,24	0,03	0,06	0,04	0,15	0,10	0,08
CD51/61	2,50	0,06	0,59	0,05	0,06	0,05	0,05	0,11	1,20	0,22	0,09
CD106	0,07	0,02	0,14	0,17	0,21	0,01	0,09	0,02	0,14	0,10	0,10
HLA ABC	0,64	14,30	1,48	2,77	34,30	6,49	0,79	54,40	9,36	18,70	7,93
HLA DR	0,06	0,03	0,33	0,05	0,25	0,07	0,06	0,04	0,11	0,09	0,06
AC133	0,09	0,11	8,25	0,10	0,11	0,04	0,15	0,04	0,19	0,09	0,10
CD13	99,10	99,30	99,30	99,80	99,60	99,60	99,80	99,70	97,30	99,60	99,60
CD29	82,80	97,50	84,40	89,80	98,90	97,70	93,90	95,60	99,50	97,20	96,40
CD44	10,70	48,80	24,00	25,20	39,90	31,90	7,49	43,50	79,70	68,20	35,90
CD49e	39,40	83,00	43,00	51,00	97,40	67,60	47	57,90	85,00	72,50	67,60
CD73	55,90	79,10	34,40	70,80	78,90	43,00	83,10	85,20	74,90	87,10	76,90
CD90	99,20	95,60	99,40	94,50	97,50	95,70	99,30	98,90	85,40	99,80	98,20
CD105	NR	86,90	NR	95,00	97,80	91,50	NR	95,40	86,70	91,60	91,60

Os números equivalem às porcentagens de positividade obtidas na região R1 para AdMSC do gráfico de tamanho por granulosidade, para os respectivos marcadores. As células foram adquiridas em citômetro de utilização-se o programa Cell Quest para aquisição e Flow Jo para análise. Foram analisados 20.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) FSC x SSC. NR- não realizado. n=10. AdMSC= células mesenquimais do tecido adiposo. Em cinza destacadas as moléculas que apresentaram variação entre as células estudadas.

Tabela 5- Caracterização imunofenotípica das AdMSC: Mediana de intensidade de fluorescência

Molécula	AdMSC2	AdMSC4	AdMSC5	AdMSC7	AdMSC9	AdMSC10	AdMSC11	AdMSC12	AdMSC13	AdMSC14	Mediana
Passagem	P4	P4	P4	P4	P5	P4	P4	P4	P4	P6	
CD14	5,25	6,53	5,78	5,78	4,66	5,79	6,63	10,20	4,31	4,96	5,78
CD31	4,94	6,05	4,72	4,78	4,12	4,89	6,10	13,40	13,70	5	4,97
CD34	5,04	5,53	5,33	4,49	4,30	6,04	7,16	10,20	13,50	4,78	5,43
CD45	5,19	6,08	5,17	4,87	4,49	5,77	6,75	9,76	11,50	4,26	5,48
CD51/61	4,93	7,45	4,84	5,73	5,25	6,09	7,04	19,20	5,91	9,56	6,00
CD106	5,32	5,61	5,15	4,49	4,59	5,62	6,63	9,91	3,71	4,70	5,24
HLA ABC	9,74	19,30	10,50	13,80	28,60	15,60	16,40	68,40	35,90	23,10	17,85
HLA DR	5,05	5,31	5,37	4,53	4,60	5,61	6,93	9,56	3,24	4,37	5,18
AC133	5,29	5,34	6,21	4,45	3,83	5,54	6,92	10	3,48	4,41	5,32
CD13	273,00	321	260,00	331	992,00	259	862	1319	1151	621	331,00
CD29	56,50	73,90	72,10	59,90	326,00	72,60	122	223	375	259	73,90
CD44	6,97	31,10	12,30	21,50	43,00	19,90	23,70	84,80	108,00	58,80	27,40
CD49e	23,30	44	24,00	29,70	108,00	36,30	49,20	71,70	96,50	90,60	46,60
CD73	28,40	46,20	21,00	38,90	72,50	26,80	80,20	116	105	80,60	59,35
CD90	354,00	116	321,00	83,50	182,00	89,10	421	692	198,00	610	198,00
CD105	NR	74,60	NR	49,60	46,10	48,30	NR	164	135	104	74,60

Os números equivalem às medianas de intensidade de fluorescência obtidas na região R1 para AdMSC do gráfico de tamanho por granulosidade, para os respectivos marcadores. As células foram adquiridas em citômetro de utilizando-se o programa Cell Quest para aquisição e Flow Jo para análise. Foram analisados 20.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) FSCx SSC. NR- não realizado. n=10. AdMSC= células mesenquimais do tecido adiposo. Em cinza destacadas as moléculas que apresentaram variação entre as células estudadas.

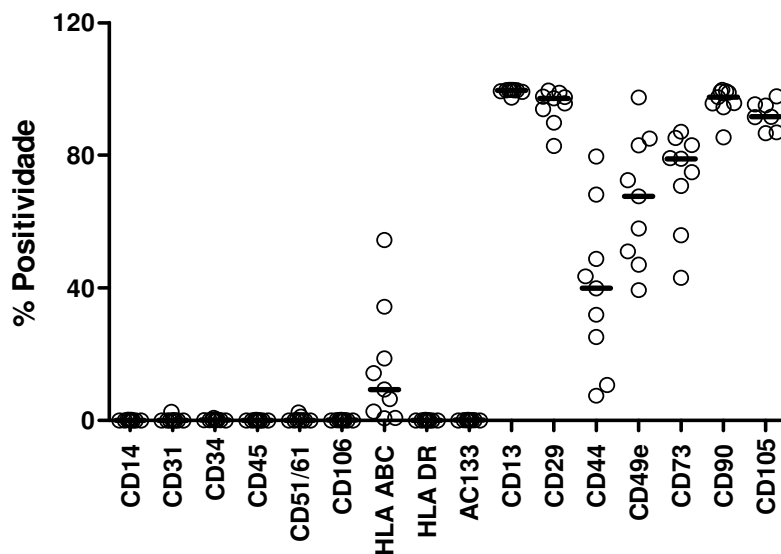


Figura 13- Imunofenotipagem das AdMSC - Porcentagens de positividade obtidas na região R1 para AdMSC do gráfico de tamanho por granulosidade, FSCx SSC, para os respectivos marcadores. As células foram adquiridas em citômetro de utilizando-se o programa Cell Quest para aquisição e Flow Jo para análise. Foram analisados 20.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). n=10. AdMSC= células mesenquimais do tecido adiposo.

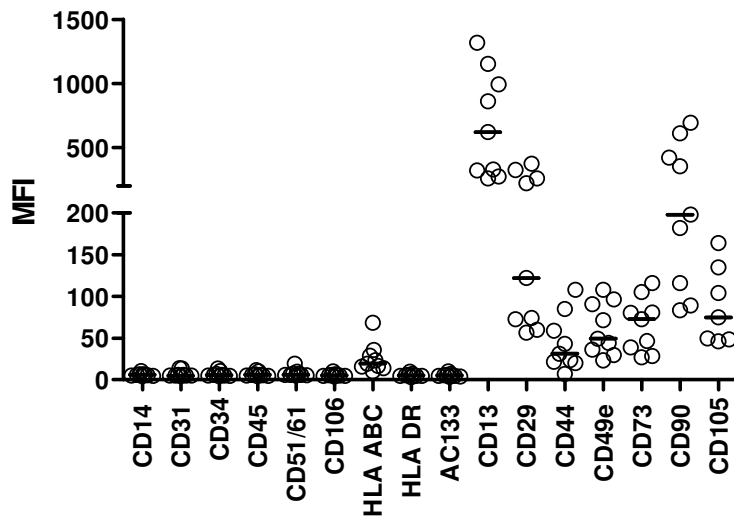


Figura 14- Imunofenotipagem das AdMSC - Mediana de intensidade de fluorescência obtidas na região R1 para AdMSC do gráfico de tamanho por granulosidade, FSCx SSC, para os respectivos marcadores. As células foram adquiridas em citômetro de utilizando-se o programa Cell Quest para aquisição e Flow Jo para análise. Foram analisados 20.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). n=10. AdMSC= células mesenquimais do tecido adiposo.

4.2 Diferenciação das AdMSC em adipócitos e osteócitos

Dentre os critérios que definem as AdMSC, está a capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares como adipócitos e osteócitos. Realizamos a diferenciação de 4 AdMSC em adipócitos e osteócitos. Todas as AdMSC foram capazes de se diferenciar em osteócitos e adipócitos, respectivamente com colorações específicas para cristais de cálcio (Von Kossa) e para grânulos de gordura (Oil Red) (**Figura 15**).

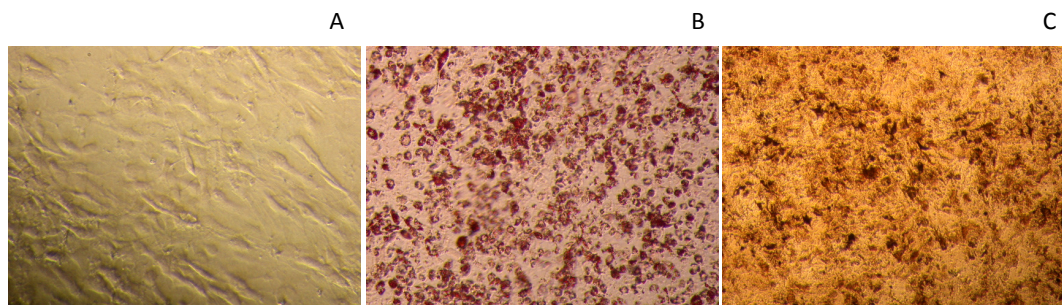


Figura 15 – Diferenciação AdMSC em adipócitos e osteócitos - A) Controle AdMSC sem tratamento para diferenciação. Aumento 20x. **B)** Após tratamento com reagentes para diferenciação em adipócitos e coloração Oil Red para grânulos de gordura, em vermelho. Aumento 10x. **C)** Após tratamento com reagentes para diferenciação em osteócitos, e coloração Von Kossa para cristais de cálcio, em marrom. Aumento 10x.

4.3 Nomenclatura das células dos ensaios de cocultivo PBMC/AdMSC

As AdMSC e as PBMC foram cocultivadas para avaliarmos diversos efeitos dessa interação tanto na inibição da proliferação, quanto na produção/expressão de proteínas e modulação da expressão gênica de moléculas relacionadas à resposta imune.

No entanto, nem todos os ensaios foram realizados para todas as 11 AdMSC. Na tabela abaixo (**Tabela 6**) encontra-se a especificação dos experimentos realizados com cada AdMSC e PBMC. Para os ensaios de Citometria de fluxo, com o objetivo de analisar a modulação de proteínas nas subpopulações celulares, usamos sempre as PBMC derivadas do mesmo indivíduo, denominadas Pe5; para os ensaios de Real time usamos sempre as PBMC denominadas Pe4; e para os ensaios com o objetivo de avaliar o efeito das AdMSC na proliferação de linfócitos T (LT) e produção de citocinas (Ensaio de proliferação e citocinas por CBA) usamos também as PBMC denominadas Pe4, com exceção dos experimentos EXP1 e EXP5.

Tabela 6- Discriminação das células utilizadas nos decorrentes experimentos de cocultivo

Número do experimento	Nomenclatura das AdMSC	Nomenclatura das PBMC nos Ensaio		
		Proliferação e citocinas (FACS)	Expressão gênica (Real time)	Expressão de proteínas (FACS)
EXP1	AdMSC2	Pe2	NR	NR
EXP2	AdMSC4	Pe4	Pe4	Pe5
EXP3	AdMSC5	Pe4	Pe4	NR
EXP4	AdMSC6	Pe4	Pe4	NR
EXP5	AdMSC7*	Pe2*	Pe4*	NR
EXP7	AdMSC9	Pe4	Pe4	Pe5
EXP8	AdMSC10	Pe4	Pe4	Pe5
EXP9	AdMSC11	Pe4	NR	NR
EXP10	AdMSC12	Pe4	Pe4	Pe5
EXP11	AdMSC13	Pe4	NR	Pe5
EXP12	AdMSC14	Pe4	Pe4	Pe5

Todos os experimentos foram realizados em co-culturas de PBMC com AdMSC, frente ao estímulo com anti-CD3, e analisados comparativamente à condição na qual as células foram cultivadas separadamente. Os ensaios de proliferação foram feitos utilizando a marcação com CFSE, analisados por FACS. A análise de citocinas foi feita por CBA (*Cytometric Bead Array*) e a análise da proteínas de superfície por FACS. * único ensaio no qual as PBMC do ensaio de proliferação foram diferentes das PBMC usadas no ensaio de Real time. AdMSC; células mesenquimais de tecido adiposo; Pe: Células mononucleares obtidas dos filtros de leucoaférese; NR: não realizado.

4.4 Efeito das AdMSC na proliferação de PBMC induzida pelo anticorpo anti-CD3

Com estes experimentos, verificamos a capacidade imunorreguladora das AdMSC sobre a proliferação das células T CD3⁺ e também da totalidade das células presentes nas PBMC marcadas com CFSE, estimuladas com anti-CD3. Este efeito funcional induzido pelas AdMSC derivadas de diferentes indivíduos, será mais adiante correlacionado, individualmente, com as modificações na produção e expressão de proteínas nas células do sistema imune e nas próprias AdMSC, bem como com a modulação da expressão gênica nas mesmas após o cocultivo.

Realizamos 11 ensaios utilizando-se as células: AdMSC2, AdMSC4, AdMSC5, AdMSC6, AdMSC7, AdMSC9 AdMSC10, AdMSC11, AdMSC12, AdMSC13. AdMSC14. As AdMSCs inibiram a proliferação nas proporções testadas (AdMSC:PBMC - 1:10; 1:50; 1:100) (**Figura 16**). No entanto, na maioria dos experimentos, na proporção 1:5, as células aderiam e se descolavam até o término do experimento. Apesar disso, em apenas 3 ensaios, nos quais foram utilizadas as AdMSC9 (EXP7), AdMSC12(EXP10) e AdMSC13 (EXP11), as células não se descolaram, o que nos permitiu analisar o efeito de supressão com uma maior proporção de AdMSC:PBMC (1:5) (**Figura 17**), atingindo quase 100% de inibição da proliferação de células T.

Considerando as três proporções celulares (1:10, 1:50 e 1:100), em todos os experimentos, a maior inibição foi observada na proporção 1:10, com média de 56% de inibição (variando de 36 a 87%) ($P < 0,001$) para as células CD3⁺, (**Figura 16A**) e de 67% (variando de 41 a 93%) ($P < 0,001$) para a totalidade das células dentro do “gate” de linfócitos (**Figura 16B**). Assim, as AdMSC também inibiram a proliferação de células não CD3⁺. Para as outras proporções AdMSC:PBMC estudadas, também observamos inibição, porém em menor intensidade e de forma decrescente, relativo ao número de AdMSC.

O padrão de inibição exercida pelas AdMSC não foi homogêneo em todos os experimentos. Tomando como exemplo a condição 1:10, em metade dos experimentos observamos inibição acima de 50% e na outra metade abaixo de 50% (**Figura 18**).

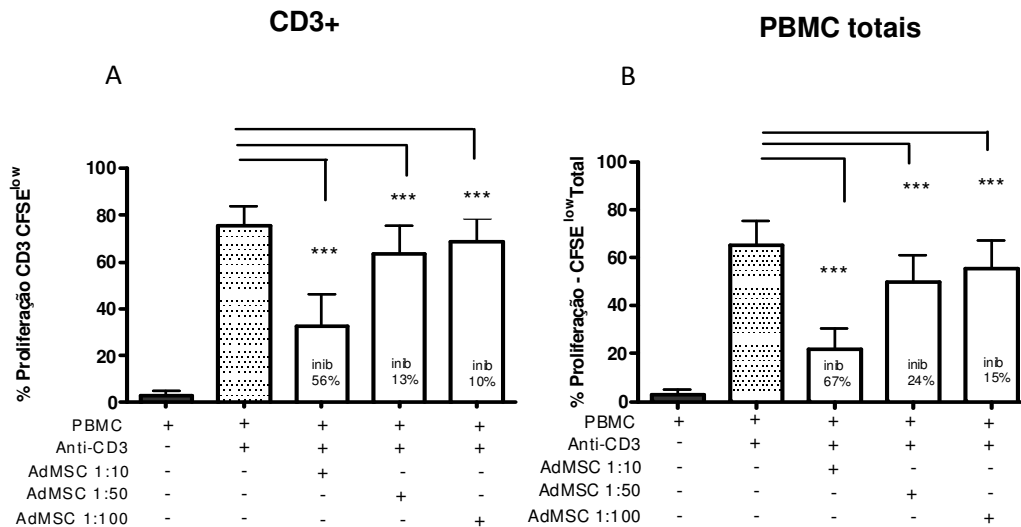


Figura 16- Efeito das AdMSC na proliferação de células CD3 positivas e de PBMC totais - Ensaio utilizando-se a marcação de CFSE (2,5 uM) para avaliar proliferação celular com estímulo com o anticorpo anti-CD3 (1µg/ml); tempo de experimentação 5 dias. Foram realizados 10 ensaios em triplicatas. Utilizamos 3 proporções de AdMSC:PBMC (1:10, 1:50, 1:100). Dentro de cada barra encontra-se o valor médio de inibição de cada condição na presença das AdMSC, comparada com a condição PBMC+anti-CD3 sem AdMSC. **A)** Efeito das AdMSC na proliferação das células CD3+. **B)** Efeito das AdMSC na proliferação das PBMC totais. Teste estatístico Wilxon – two tailed, *** p=0,001. PBMC: células mononucleares de sangue periférico; Ad MSC: Células mesenquimais de tecido adiposo. Inib: inibição.

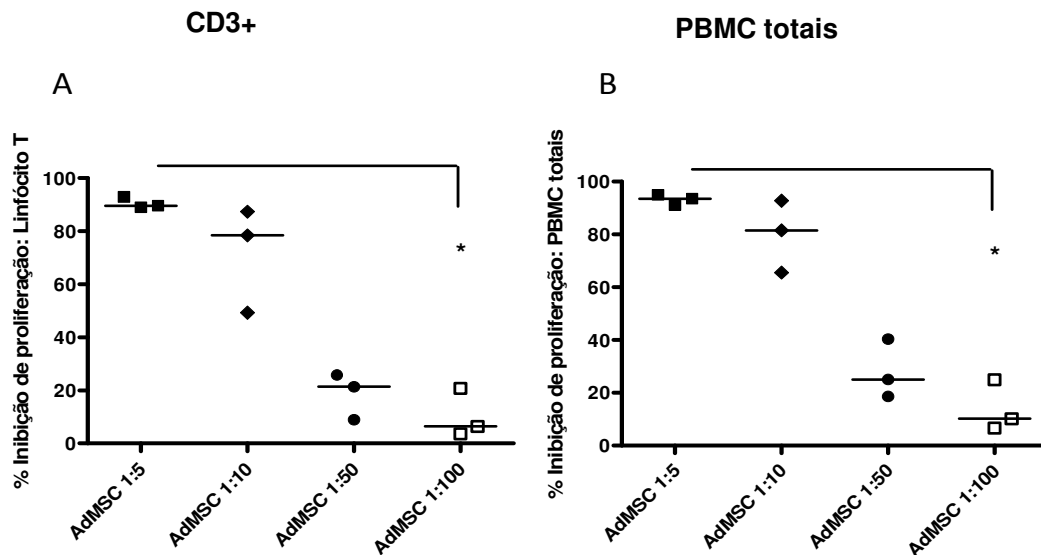


Figura 17- Capacidade supressora das AdMSC é dose dependente - Ensaio utilizando-se marcação de CFSE (2,5 uM) para a avaliação do efeito das AdMSC na proliferação celular com estímulo com o anticorpo anti-CD3 (1µg/ml); tempo de experimentação 5 dias. Apenas 3 células se mantiveram aderidas até o quinto dia em todas as proporções de AdMSC:PBMC (1:5, 1:10, 1:50, 1:100). As linhas representam a mediana de inibição da proliferação da condição com AdMSC + PBMC+anti-CD3 em relação à condição sem AdMSC. **A)** % de inibição das células CD3+. **B)** % de inibição das PBMC totais. N=3, Ad MSC: Células mesenquimais de tecido adiposo. PBMC: Células mononucleares de sangue periférico. Teste estatístico: One way ANOVA, Friedman test seguido de post Dunn's multiple comparison test. * p<0,05.

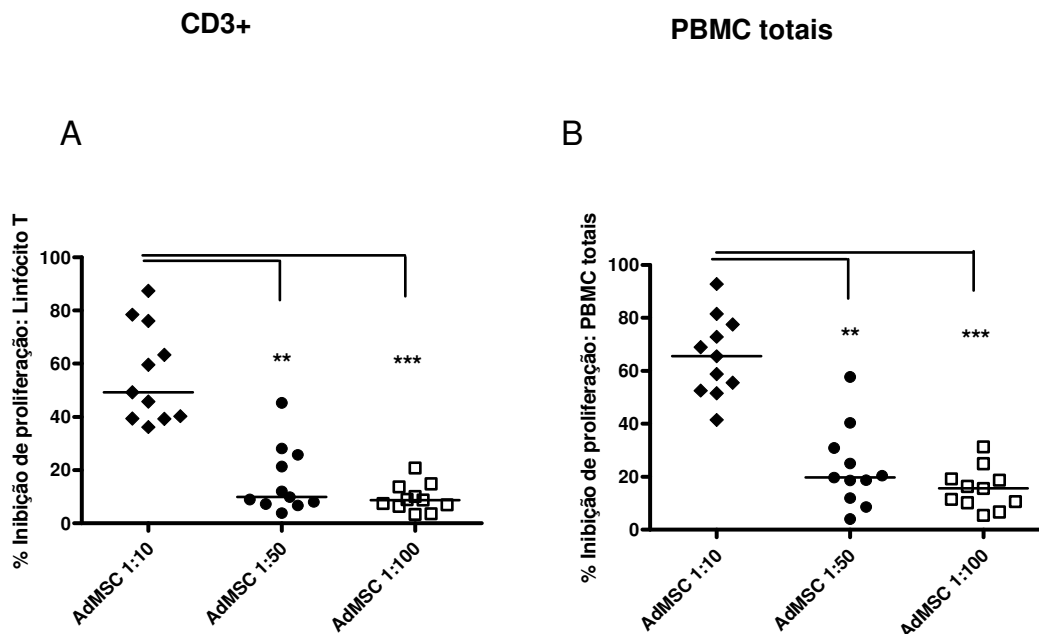


Figura 18- Capacidade supressora das AdMSC é dose dependente- Ensaio utilizando-se marcação de CFSE (2,5 μ M) para avaliação do efeito das AdMSC na proliferação celular com estímulo com o anticorpo anti-CD3 (1 μ g/ml); tempo de experimentação 5 dias. Em todos os ensaios concentrações avaliadas de MSC:PBMC (1:10, 1:50, 1:100). As linhas representam a mediana de inibição da proliferação da condição com AdMSC + PBMC+anti-CD3 em relação à condição sem AdMSC. **A)** % de inibição das células CD3+. **B)** % de inibição das PBMC totais. N=11, Ad MSC: Células mesenquimais de tecido adiposo. PBMC: Células mononucleares de sangue periférico. Teste estatístico: One way ANOVA, Friedman test seguido de post Dunn's multiple comparison test. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.5 Efeito da interação AdMSC/PBMC na produção de citocinas nos sobrenadantes das coculturas

Avaliamos o efeito da interação das MSC com as PBMC estimuladas com o anticorpo anti-CD3 na produção de diversas citocinas relacionadas com a resposta imune, nas mesmas 11 culturas utilizadas para os ensaios de proliferação citados na seção anterior. Esta análise foi realizada nos sobrenadantes do 1^o, 3^o e 5^o dia de cultura, lembrando que o ensaio de inibição de proliferação foi feito no dia 5^o de cultura. As citocinas avaliadas foram IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 do kit CBA human Th1/Th2 (Cytometric Beads

Array). Os limites de detecção mínimo e máximo foram de 5pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente.

As citocinas mais produzidas pelas PBMC com o estímulo de anti-CD3 foram: IL-10 (**Tabela 7**), TNF- α (**Tabela 8**), IFN- γ (**Tabela 9**), e em menor intensidade IL-2 (**Tabela 10**), IL-4 (**Tabela 11**), e IL-5 (**Tabela 12**). Os valores das medianas de produção (pg/ml) correspondente a cada dia para as citocina mais produzidas foram: TNF- α (1d – 2155,19; 3d – 783,76; 5d – 479,56), IFN- γ (1d – 149,94; 3d – 916,15; 5d – 916,15), IL-10 (1d – 279,24; 3d – 314,82; 5d – 178,78), e em menor intensidade IL-2 (1d – 33,17; 3d – 8,38; 5d – 14,66), IL-4 (1d – 9,21; 3d – 9,21; 5d – 11,94); IL-5 (1d – 20,96; 3d – <5,0; 5d – <5,0).

4.5.1 Cinética com estímulo anti-CD3

Nos dias 1, 3 e 5 de cultura, observamos a produção induzida ou aumentada pelo estímulo com anti-CD3 das citocinas: IL-10, IFN- γ e TNF- α apesar de não ter sido uniforme em todos os experimentos. A cinética de produção de citocinas com o estímulo com anti-CD3 não nos permitiu verificar diferenças estatísticas na produção dessas citocinas entre os três dias de estudo. No entanto, os valores maiores de produção foram encontrados nos dias 3 para IL-10, 1 para TNF- α e 3 e 5 para IFN- γ . Os dados são mostrados descontando-se a produção basal correspondente de cada citocina (**Figura 19**).

4.5.2 Efeito das AdMSC na produção de citocinas

O efeito das AdMSC sobre a produção das citocinas foi observado principalmente para as citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α . Em todos os dias do ensaio, observamos algum efeito das AdMSC sobre a produção de citocinas nas coculturas. Os efeitos mais marcantes foram observados para as culturas na razão AdMSC/PBMC de 1:10.

Na análise conjunta dos experimentos, observamos que os valores de produção de citocinas foram significativamente menores em relação à condição das PBMC estimuladas com anti-CD3 e sem as AdMSC. Para TNF- α houve 37% de diminuição na proporção 1:10, no dia 1 ($p < 0,05$); já no dia 3 observamos diminuição da produção nas três proporções estudadas, 1:10 (76% ($p < 0,001$), 1:50 (49% ($p < 0,01$)) e 1:100 (44% ($p < 0,05$)). Da mesma forma, observamos diminuição para todas as proporções no dia 5 sendo (77% ($p < 0,01$), 66% ($p < 0,01$)) e 48% ($p < 0,05$), respectivamente) (**Figura 20 e Tabela 8**). É interessante apontar que no dia 1 de cultura observamos principalmente um aumento de produção de IL-10 na razão 1:10 (83%) ($p < 0,05$) (**Figura 21**).

Para o IFN- γ também houve uma diminuição da produção na presença das AdMSC nas três proporções estudadas nos dias 3 (66%, 40% e 23% de diminuição para as proporções 1:10, 1:50 e 1:100 respectivamente, $p < 0,05$) e no dia 5 (63%, 37% e 25% de diminuição para as proporções 1:10, 1:50 e 1:100 respectivamente, $p < 0,05$). No entanto, o nosso n experimental para esse cálculo foi reduzido, pois os valores detectados na condição de comparação foram superiores ao limite máximo de detecção (5000pg/ml). Assim em apenas

4 experimentos realizamos uma diluição intermediária do sobrenadante (1/10) para podermos detectar a produção dessa citocina.

Para outras citocinas, não observamos diferenças significativas entre as medianas de pg/ml, nas condições com anti-CD3 com e sem as AdMSC, em qualquer das concentrações de AdMSC/PBMC.

Fizemos a análise individual dos resultados para todos os experimentos na condição em que as AdMSC estavam na razão 1:10; a mesma utilizada nos ensaios nos quais avaliamos expressão gênica e protéica nas AdMSC e nos LT associada à supressão de proliferação. Observamos modificações na produção de citocinas na maioria dos experimentos para as citocinas: IL-10, TNF- α e IFN- γ . Para a IL-10 (**Figura 21**) observamos no dia 1 de cultura aumento da produção variando 31 a 580% em 7 de 9 experimentos. Em contraste, nos dias 3 e 5 de cultura não observamos modulação dessa citocinas, na presença das AdMSC (**Tabela 7**).

Como citado anteriormente, para o IFN- γ não pudemos calcular o valor de inibição em todos os experimentos. No entanto, em apenas 4 ensaios, realizamos a dosagem dessa citocina com o sobrenadante diluído (1/10), e assim, pudemos observar em todos eles diminuição da produção de IFN- γ tanto no dia 3 (variando de 55% a 94%) quanto no dia 5 (variando de 42% a 71%) (**Figura 22 e Tabela 9**).

Para TNF- α , observamos diminuição de produção na presença das AdMSC, em todos os experimentos, dia 3 (de 51% a 99%), dia 5 (de 42% a 99%), e para dia 1 em 8 de 9 experimentos observamos diminuição de 16% a 94% (**Figura 20 e Tabela 8**).

Em resumo, o efeito dominante da interação das AdMSC com as PBMC estimuladas com anti-CD3 foi de diminuição de citocinas predominantemente pró-inflamatórias e aumento da IL-10.

Tabela 7 - Produção de IL-10 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas

IL10 (pg/ml) - 1d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	92,25	14,66	27,498193	10,4	10,4	176,31	176,31	176,31	176,31	92,25
PBMC+anti-CD3	285,87	45,35	388,82	253,36	253,36	279,24	279,24	279,24	279,24	279,24
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	981,1	308,59	509,93	216,2	105,61	894,1	413,35	532,77	720,56	509,93
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	565,08874	125,28	551,58	245,95	189,93	584,37	452,07	357,73	436,19	436,19
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	437,87	109,75	425	182,48	114,63	452,07	250,87	274,11	351,29	274,11
AdMSC pura			5,82	< 5,0	< 5,0	94,18	6,37	8,87	< 5,0	7,62

IL10 (pg/ml) - 3d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	108,42	18,29	132,90	11,24	11,24	85,56	85,56	85,56	85,56	85,56
PBMC+anti-CD3	642,09	310,15	543,52	1014,51	1014,51	314,82	314,82	314,82	314,82	314,82
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	869,09	307,02	294,36	186,17	106,70	549,47	314,82	293,82	354,5	307,02
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	643,40	142,52	450,91	430,20	364,48	409,65	288,44	238,25	306,26	364,48
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	501,60	165,49	318,80	314,67	271,49	388,10	157,55	175,45	100,86	271,49
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

IL10 (pg/ml) - 5d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	65,20	18,06	72,86	14,80	14,80	50,96	50,96	50,96	50,96	50,96
PBMC+anti-CD3	451,19	197,74	178,78	694,54	694,54	167,11	167,11	167,11	167,11	178,78
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	564,73	156,24	177,89	147,76	85,91	335,65	167,93	151,45	190,5	167,93
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	378,55	104,50	215,65	260,98	274,18	202,76	129,72	131,70	157,55	202,76
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	297,80	107,10	174,31	238,76	182,48	227,27	141,28	131,70	144,84	174,31
AdMSC pura			11,47	< 5,0	< 5,0	66,86	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

Produção da citocina IL-10 medida no sobrenadante das culturas, medida pelo kit "Human CBA Th1/Th2" e analisadas por citometria de fluxo. Valores em pg/ml de cada experimento analisado em todas as condições do ensaio de proliferação, e mediana de produção, à direita da tabela. As medições foram realizadas nos 3 tempos de estudo. PBMC: Células mononucleares; AdMSC: Células mesenquimais de tecido adiposo Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. N=9

Tabela 8 - Produção de TNF- α nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas

TNF (pg/ml) - 1d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	2110,95	1048,13	1823,625	< 5,0	< 5,0	1773,06	1773,06	1773,06	1773,06	1773,06
PBMC+anti-CD3	3365,53	1999,84	1804,37	1033,06	1033,06	2155,19	2155,19	2155,19	2155,19	2155,19
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	2822,19	2084,81	1020,97	61,28	43,94	1788,26	1438,96	1420,62	1408,53	1420,62
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	2808,385	1763,34	1767,63	225,86	282,33	2248,39	1628,41	1508,13	1980,03	1763,34
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	3058,43	2016,58	1749,55	349,53	293,51	2306,19	1834,37	1728,39	1865,81	1834,37
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	415,26	< 5,0	6,1	< 5,0	< 5,0

TNF (pg/ml) - 3d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	708,53	277,8	195,57	< 5,0	< 5,0	444,07	444,07	444,07	444,07	444,07
PBMC+anti-CD3	1733,79	851,89	484,79	626,64	626,64	783,76	783,76	783,76	783,76	783,76
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	728,56	417,69	85,02	8,01	8,85	242,69	191,18	105,2	240,45	191,18
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	1006,544	399,39	443,21	70,11	113,1	646,71	289,1	278,7	487,59	399,39
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	1160,593	584,9701	441	132,26	132,26	981,92	413,41	525,77	286,47	441
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	30,45	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

TNF (pg/ml) - 5d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	392,6571	114,0572	89,7	28,17	28,17	216,03	216,03	216,03	216,03	216,03
PBMC+anti-CD3	996,45	388,35	77,22579	336,22	336,22	470,56	470,56	470,56	470,56	470,56
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	401,39	177,31	44,67	5,66	2,83	190,28	77,42	107,32	132,74	107,32
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	508,19	217,39	142,36	30	< 5,0	276,15	120,91	148,43	201,35	174,89
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	570,38	311,47	151,45	65,06	67,04	450,05	244,95	195,74	302,63	244,95
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	36,06	< 5,0	6,37	< 5,0	< 5,0

Produção da citocina TNF- α medida no sobrenadante das culturas, medida pelo kit "Human CBA Th1/Th2" e analisadas por citometria de fluxo. Valores em pg/ml de cada experimento analisado em todas as condições do ensaio de proliferação, e mediana de produção, à direita da tabela. As medições foram realizadas nos 3 tempos de estudo. PBMC: Células mononucleares; AdMSC: Células mesenquimais de tecido adiposo Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. N=9

Tabela 9 - Produção de IFN- γ nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante diluído (1/10) das culturas

IFN γ (pg/ml) - 1d					
diluídas 1/10	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	13,96	13,96	13,96	13,96	13,96
PBMC+anti-CD3	149,94	149,94	149,94	149,94	149,94
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	157,9	127,99	140,08	182,99	148,99
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	142,31	119,33	135,71	153,08	139,01
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	135	86,68	63,39	123,93	105,31
AdMSC pura	14,25	< 5,0	< 5,0	5,73	< 5,0

IFN γ (pg/ml) - 3d					
diluídas 1/10	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	43,9	43,9	43,9	43,9	43,90
PBMC+anti-CD3	916,15	916,15	916,15	916,15	916,15
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	205,18	59,14	410,35	410,35	307,77
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	714,22	195,27	592,6	511,65	552,13
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	843,75	634,5	485,51	783,05	708,78
AdMSC pura	47,32	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

IFN γ (pg/ml) - 5d					
diluídas 1/10	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	47,32	47,32	47,32	47,32	47,32
PBMC+anti-CD3	916,15	916,15	916,15	916,15	916,15
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	477,07	270,14	333,14	348,75	340,95
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	629,12	403,06	525,18	634,5	577,15
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	886,54	553,19	452,52	812,9	683,05
AdMSC pura	37,31	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

Produção da citocina IFN- γ medida no sobrenadante das culturas, medida pelo kit "Human CBA Th1/Th2" e analisadas por citometria de fluxo. Valores em pg/ml de cada experimento analisado em todas as condições do ensaio de proliferação, e mediana de produção à direita da tabela. As medições foram realizadas nos 3 tempos de estudo, nos sobrenadantes diluídos 1/10, pois nas mesmas condições das outras citocinas, os valores ultrapassaram o limite de detecção do Kit. PBMC: Células mononucleares; AdMSC: Células mesenquimais de tecido adiposo Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. N=4 (sobrenadantes diluídos).

Tabela 10- Produção de IL-2 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas

IL2 (pg/ml) - 1d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	< 5,0	< 5,0	36,62	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	41,56	17,42	31,89	223,70	223,70	33,17	33,17	33,17	33,17	33,17
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	79,31	82,15	24,02	275,99	111,09	33,47	31,66	46,75	28,17	46,75
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	53,40	23,84	20,74	228,23	208,52	21,76	21,21	24,32	23,79	23,84
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	43,23	24,75	14,72	206,43	120,60	19,49	21,21	40,84	20,71	24,75
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	19,47	< 5,0	15,03	12	< 5,0

IL2 (pg/ml) - 3d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	< 5,0	< 5,0	< 5,0	13,65	13,65	8,38	8,38	8,38	8,38	8,38
PBMC+anti-CD3	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	8,38	8,38	8,38	8,38	8,38
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	< 5,0	6,06	< 5,0	72,49	10,06	9,55	< 5,0	24,9	7,23	9,81
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	26,20	< 5,0	< 5,0	5,23	< 5,0	9,16	33,47	< 5,0	37,23	26,20
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	30,94	17,80	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	24,07	9,62	52,69	24,07
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	26,49	5,19	14,58	16,39	15,49

IL2 (pg/ml) - 5d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	27,69	18,03	< 5,0	16,50	16,50	12,84	12,84	12,84	12,84	14,67
PBMC+anti-CD3	17,10	< 5,0	12,22	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	14,66
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	60,64	42,2	27,05	7,23	< 5,0
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	51,96	46,75	< 5,0	37,23	< 5,0
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	34,08	50,42	78,46	52,69	51,56
AdMSC pura			9,64	< 5,0	< 5,0	52,31	< 5,0	15,48	16,39	15,94

Produção da citocina IL-2 medida no sobrenadante das culturas, medida pelo kit "Human CBA Th1/Th2" (BD Biosciences, CA, EUA) e analisadas por citometria de fluxo. Valores em pg/ml de cada experimento analisado em todas as condições do ensaio de proliferação, e mediana de produção, à direita da tabela. As medições foram realizadas nos 3 tempos de estudo. PBMC: Células mononucleares; AdMSC: Células mesenquimais de tecido adiposo. Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. N=9

Tabela 11 - Produção de IL-4 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas

IL4 (pg/ml) - 1d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	12,34	5,33	8,35	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	25,2	15,41	< 5,0	13,13	13,13	5,28	5,28	5,28	5,28	9,21
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	29,35	17,29	< 5,0	15,20	8,86	6,34	9,63	7,78	< 5,0	9,63
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	28,35	15,23	< 5,0	19,49	11,87	4,39	10,2	< 5,0	8,88	11,87
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	25,20	22,36	< 5,0	14,89	11,53	13,79	7,42	15,27	< 5,0	14,89
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	7,42	< 5,0	7,42

IL4 (pg/ml) - 3d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	16,52	14,7	< 5,0	6,14	6,14	9,26	9,26	9,26	9,26	9,26
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	8,17	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	11,96	24,75	23,71	7,42	11,96
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	21,05	6,11	< 5,0	< 5,0	< 5,0	6,7	13,79	15,27	6,7	10,25
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	21,91	14,42	5,22	< 5,0	< 5,0	7,42	7,06	7,42	17,24	7,42
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	32,53	< 5,0	< 5,0	6,52	19,53

IL4 (pg/ml) - 5d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	14,02	9,46	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	15,62	6,12	11,94	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	11,94
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	9,8	12,34	7,40	< 5,0	< 5,0	85,25	44,8	21,24	15,48	15,48
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	18,38	26,87	34,64	42,04	< 5,0
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	< 5,0	6,69	< 5,0	< 5,0	< 5,0	21,04	48,02	56,02	22,45	22,45
AdMSC pura			6,83	< 5,0	< 5,0	48,38	6,34	< 5,0	< 5,0	6,83

Produção da citocina IL-4 medida no sobrenadante das culturas, medida pelo kit "Human CBA Th1/Th2" (BD Biosciences, CA, EUA) e analisadas por citometria de fluxo. Valores em pg/ml de cada experimento analisado em todas as condições do ensaio de proliferação, e mediana de produção, à direita da tabela. As medições foram realizadas nos 3 tempos de estudo. PBMC: Células mononucleares; AdMSC: Células mesenquimais de tecido adiposo Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. N=9

Tabela 12 – Produção de IL-5 nos dias 1, 3 e 5 no sobrenadante das culturas

IL5 (pg/ml) - 1d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC		< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	< 5,0	< 5,0	< 5,0	20,96	20,96	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	20,96
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	6,69	< 5,0	< 5,0	26,57	18,43	6,83	< 5,0	5,78	5,74	6,76
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	5,99	< 5,0	< 5,0	32,06	25,79	6,13	< 5,0	< 5,0	5,3	6,13
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	< 5,0	< 5,0	< 5,0	26,31	20,14	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	23,23
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

IL5 (pg/ml) - 3d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	< 5,0	Undet,	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	5,57	14,70	< 5,0	84,14	84,14	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	8,09	< 5,0	< 5,0	29,92	26,05	5,48	6,87	9,86	< 5,0	8,98
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	10,51	6,11	< 5,0	66,87	60,53	9,05	6,49	7,22	6,13	8,14
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	9,91	14,42	< 5,0	57,59	58,16	5,82	< 5,0	6,21	< 5,0	12,16
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

IL5 (pg/ml) - 5d										
	EXP9	EXP7	EXP4	EXP10	EXP11	EXP2	EXP3	EXP8	EXP12	Mediana
PBMC	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3	7,27	6,29	< 5,0	90,24	90,24	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:10	12,44	11,99	< 5,0	29,92	28,75	16,22	9,21	9,53	9,37	12,22
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:50	9,48	14,08	< 5,0	68,22	66,87	15,8	10,49	10,03	10,26	12,29
PBMC+anti-CD3+AdMSC 1:100	5,52	13,00	< 5,0	64,26	64,9	11,03	5,97	7,35	10,26	10,65
AdMSC pura			< 5,0	< 5,0	1,01	8,84	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0

Produção da citocina IL-5 medida no sobrenadante das culturas, medida pelo kit “Human CBA Th1/Th2” (BD Biosciences, CA, EUA) e analisadas por citometria de fluxo. Valores em pg/ml de cada experimento analisado em todas as condições do ensaio de proliferação, e mediana de produção, à direita da tabela. As medições foram realizadas nos 3 tempos de estudo. PBMC: Células mononucleares; AdMSC: Células mesenquimais de tecido adiposo Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. N=9

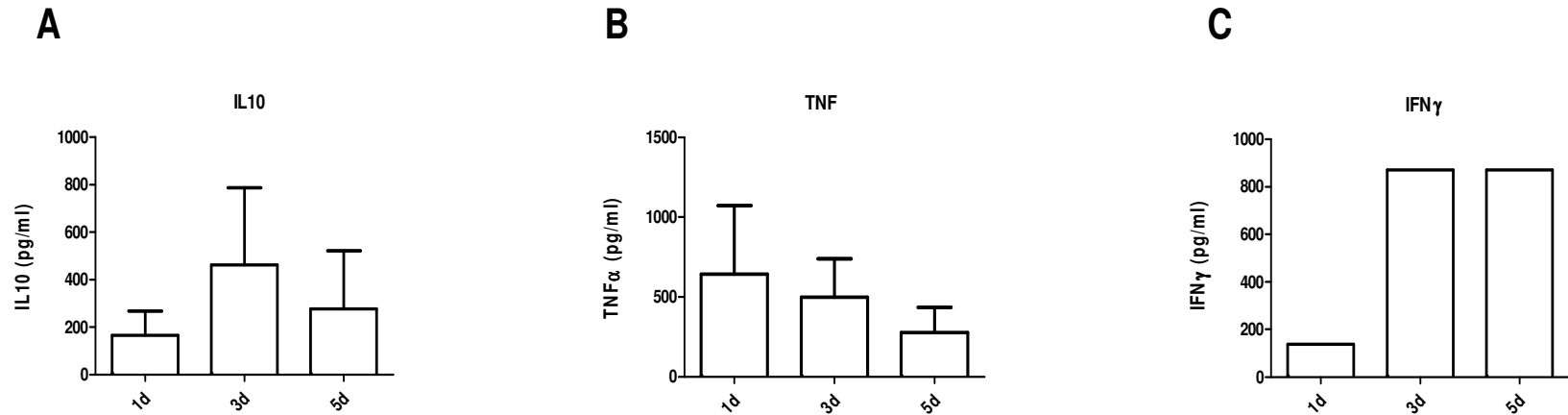


Figura 19- Cinética da produção de citocinas em PBMC estimuladas com anti-CD3- Produção de citocinas no sobrenadante das PBMC estimuladas com anti-CD3 após 1d, 3d e 5d de cultura. Os valores mostrados nos gráficos indicam a produção da citocina na condição com anti-CD3, descontada da condição basal de cada respectivo experimento. Citocinas medidas pelo kit “Human CBA Th1/Th2” e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Produção de IL-10 em pg/m. **B)** Produção de TNF- α em pg/ml; **C)** Produção de IFN- γ em pg/ml. Este não possui as linhas equivalentes à média, pois os 4 ensaios foram realizados com as mesmas PBMC uma única vez, variando apenas as AdMSC portanto os valores de produção da condição de comparação (PBMC + antiCD3) são os mesmos. A detecção do IFN- γ foi feita separadamente pois precisamos diluir o sobrenadante 1:10 uma vez a que produção da citocina na presença do estímulo anti-CD3 ultrapassou o limite de detecção da técnica em todos os experimentos. Limite de detecção de 5pg/ml a 5000pg/ml. Não houve diferença estatística entre as condições estudadas. Os gráficos A e B representam a produção média de 9 experimentos realizados.

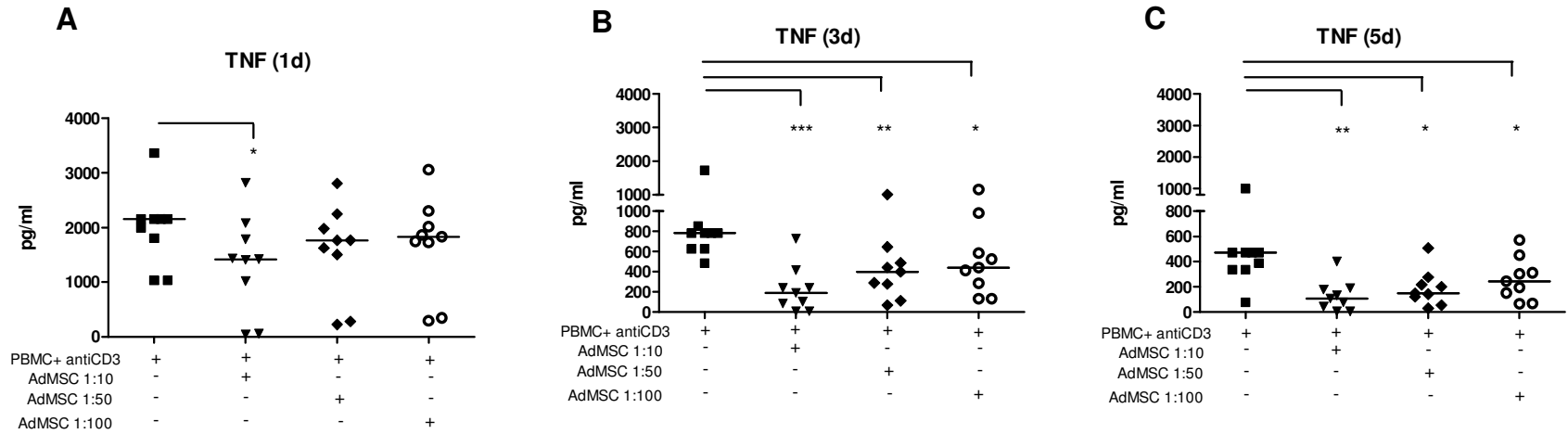


Figura 20 - Efeito das AdMSC na produção de TNF- α nas coculturas de AdMSC e PBMC estimuladas com anticorpo anti-CD3: Produção de citocinas no sobrenadante dos cocultivos de MSC+PBMC em diferentes proporções AdMSC:PBMC (1:10, 1:50 e 1:100) após 1, 3 e 5 dias de cultivo, medidas pelo kit "Human CBA Th1/Th2" e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam a produção mediana de 9 experimentos realizados com as AdMSC de diferentes indivíduos. As AdMSC induziram uma diminuição da produção de TNF- α em todas as proporções e tempos estudados. **A)** Produção de TNF- α em pg/m no dia1 de co-cultura; **B)** Produção de TNF- α em pg/m no dia 3 de co-cultura; **C)** Produção de TNF- α em pg/m no dia 5 de co-cultura. Limite de detecção de 5 pg/ml a 5000pg/ml. Teste estatístico Mann Whitney . * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

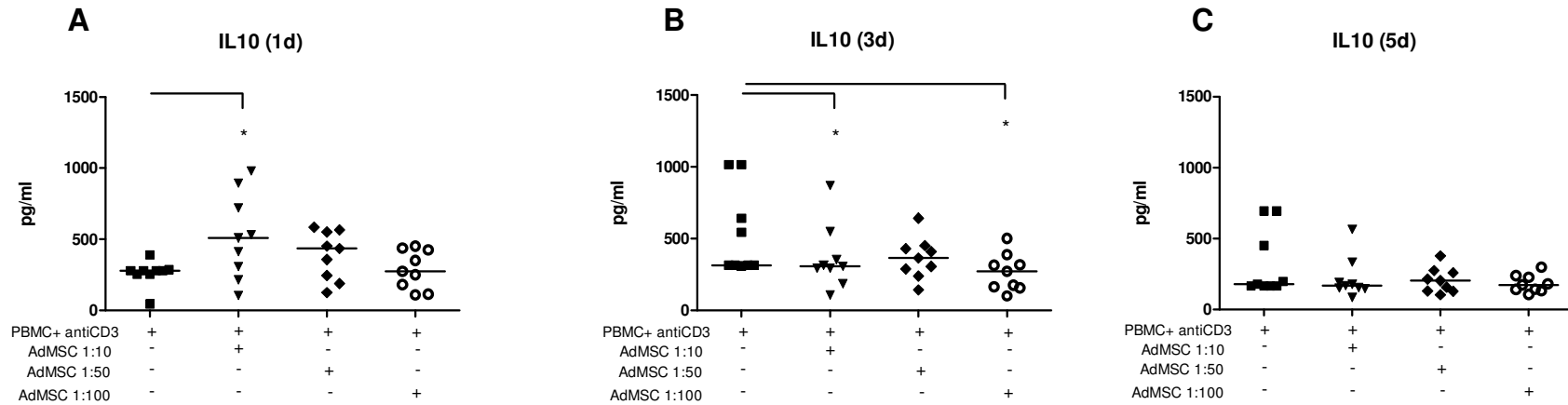


Figura 21 - Efeito das AdMSC na produção de IL-10 nas coculturas de AdMSC e PBMC estimuladas com anticorpo anti-CD3: Produção de citocinas no sobrenadante dos cocultivos de MSC+PBMC em diferentes proporções AdMSC:PBMC (1:10, 1:50 e 1:100) após 1, 3 e 5 dias de cultivo, medidas pelo kit “Human CBA Th1/Th2” e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam a produção mediana de 9 experimentos realizados, com as AdMSC de diferentes indivíduos. As AdMSC induziram um aumento da produção de IL-10 apenas no dia 1. **A)** Produção de IL-10 em pg/m no dia 1 de co-cultura. **B)** Produção de IL-10 em pg/m no dia 3 de co-cultura. **C)** Produção de IL-10 em pg/m no dia 5 de co-cultura. Limite de detecção de 5 pg/ml a 5000pg/ml. Teste estatístico Mann Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

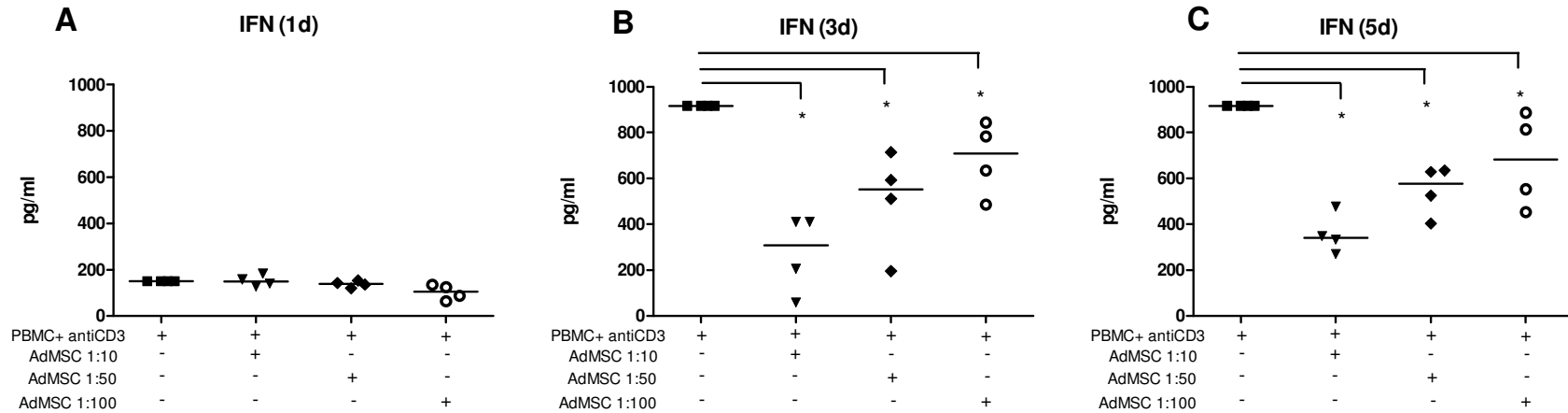


Figura 22- Efeito das AdMSC na produção de IFN- γ nas coculturas de AdMSC e PBMC estimuladas com anticorpo anti-CD3: Produção de citocinas no sobrenadante (diluídos 1:10) dos cocultivos de MSC+PBMC em diferentes proporções AdMSC:PBMC (1:10, 1:50 e 1:100) após 1, 3 e 5 dias de cultivo, medidas pelo kit “Human CBA Th1/Th2” e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam a produção mediana de 4 experimentos realizados, com as AdMSC de diferentes indivíduos. As AdMSC aparentemente induziram diminuição da produção de IFN- γ apenas nos dia 3 e 5. **A)** Produção de IFN- γ em pg/m no dia 1 de cocultura. **B)** Produção de IFN- γ em pg/m no dia 3 de cocultura. **C)** Produção de IFN- γ em pg/m no dia 5 de cocultura. Limite de detecção de 5 pg/ml a 5000pg/ml. Teste estatístico Mann Whitney, * $p < 0,05$.

Analisamos se as modificações significativas em relação à produção dessas citocinas, na condição com proporção AdMSC/PBMC de 1:10, estavam relacionados com a maior capacidade supressora das AdMSC, nos ensaios de proliferação. Para os ensaios nos quais observamos maior supressão de proliferação (>50%), encontramos correlação positiva entre a diminuição da produção de IFN- γ e TNF- α (valor de correlação 1,0 e $p < 0,001$) no dia 1 de cultura (**Figura 23**). No grupo de ensaios com menor supressão da proliferação, esta correlação entre IFN- γ e TNF- α também foi observada, no entanto, apenas nos dias 3 ($\rho = 0,8627$ e $p < 0,05$) e 5 ($\rho = 0,9963$ e $p < 0,001$) (**Figura 23**). Outro ponto que nos chamou a atenção foi o fato de haver apenas esta correlação entre a modulação das citocinas exclusiva do grupo de ensaios com maior supressão, diferentemente do que observamos no grupo de ensaios com menor supressão. Neste grupo há um número maior de correlações entre as citocinas, como entre IL-4 e IL-2 ($\rho = 0,9875$ e $p < 0,001$), IL-4 e IL-5 ($\rho = 0,7887$ e $p < 0,01$), além de TNF α e IL-5 ($\rho = -0,6348$ e $p < 0,05$) no dia 1, e entre IFN- γ e IL-2 ($\rho = -0,8452$ e $p < 0,05$), IFN- γ e IL-4 ($\rho = -0,8825$ e $p < 0,05$), IFN- γ e IL-5 ($\rho = -0,8468$ e $p < 0,05$), e entre IFN- γ e TNF- α ($\rho = 0,9963$ e $p < 0,05$) (**Figura 23**).

Menor supressão							Maior supressão						
1 DIA							1 DIA						
Menor supressão da proliferação	il2	il4	il5	il10	tnf	ifn	Maior supressão da proliferação	il2	il4	il5	il10	tnf	ifn
il2	1						il2	1					
il4	0,9875***	1					il4		1				
il5	0,7788**	0,7887**	1				il5	0,7910*		1			
il10				1			il10				1		
tnf			-0,6349*		1		tnf					1	
ifn						1	ifn					1,0000***	1
3 DIA							3 DIA						
Menor supressão da proliferação	il2	il4	il5	il10	tnf	ifn	Maior supressão da proliferação	il2	il4	il5	il10	tnf	ifn
il2	1						il2	1					
il4		1					il4		1				
il5			1				il5			1			
il10				1			il10				1		
tnf					1		tnf					1	
ifn					0,8627*	1	ifn						1
5 DIA							5 DIA						
Menor supressão da proliferação	il2	il4	il5	il10	tnf	ifn	Maior supressão da proliferação	il2	il4	il5	il10	tnf	ifn
il2	1						il2	1					
il4	0,9323***	1					il4	0,8106*	1				
il5			1				il5			1			
il10				1			il10				1		
tnf					1		tnf					1	
ifn	-0,8452*	-0,8825*	-0,8468*		0,9963***	1	ifn						1

Figura 23 - Matriz de correlação de citocinas produzidas nos sobrenadantes do cocultivo, 1d, 3d e 5d nos grupos de experimentos com maior e menor capacidade supressora de proliferação. Produção de citocinas avaliada no sobrenadante após 1, 3 e 5 dias de cocultivo. Marcadas em cinza, as correlações exclusivas de cada grupo, onde foi observada supressão de proliferação menor do que 50% ou maior do que 50%. n=9 experimentos. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Vale destacar a forte correlação entre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ apenas no dia 1 entre os experimentos de maior supressão, e entre as mesmas citocinas apenas mais tardiamente, dias 3 e 5, nos experimentos onde observamos menor supressão da proliferação.

4.6 Efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão de proteínas da resposta imune nos LT e nas AdMSC

4.6.1 Análise conjunta de todos os experimentos

Avaliamos, em ambas as populações celulares, o efeito da interação das AdMSC com as PBMC estimuladas com o anticorpo anti-CD3 na expressão de diversas proteínas relacionadas com a resposta imune, por citometria de fluxo. Essa análise foi pareada em 6 dos 11 ensaios de análise de inibição de proliferação, (EXP2-AdMSC4, EXP7-AdMSC9, EXP8-AdMSC10, EXP10-AdMSC12, EXP11-AdMSC13, EXP12-AdMSC14). Esta análise foi realizada no dia 3º de cultura, enquanto o ensaio de inibição de proliferação foi feito no dia 5 de cultura. As moléculas analisadas estão especificadas na **Tabela 2**.

A interação das AdMSC com as PBMC estimuladas com o anticorpo anti-CD3 induziu a modificação na expressão de diversas moléculas tanto nas AdMSC quanto nos linfócitos T. **Nas AdMSC**, observamos, na análise conjunta, um aumento significativo na mediana do número de células com expressão de PD1L (em média, 1815% de aumento, variando de 231% a 5205%, $p=0,0156$) (**Figura 24A**), assim como aumento da sua mediana de intensidade de fluorescência (MFI) (em média 702% de aumento, variando de 57% a 4205%). Observamos também aumento das células com expressão simultânea de CXCL10 e CCL5 (em média 800% de aumento, variando de 26% a 2265% , $p=0,0156$) (**Figura 24D**). Para ambas as moléculas também observamos aumento significativo da mediana de intensidade de fluorescência para CCL5 (em média 158% de aumento, variando de 59 a 361%) e para CXCL10 (em

média 785% de aumento, variando de 40 a 216%) (**Figura 25 B e C**). Em contraste, para LAP observamos diminuição do número de células positivas (em média 55% de diminuição, variando de 31 a 84%) (**Figura 24B**). Para as outras moléculas estudadas (CD80,CD86 e HLADR) não observamos modificações.

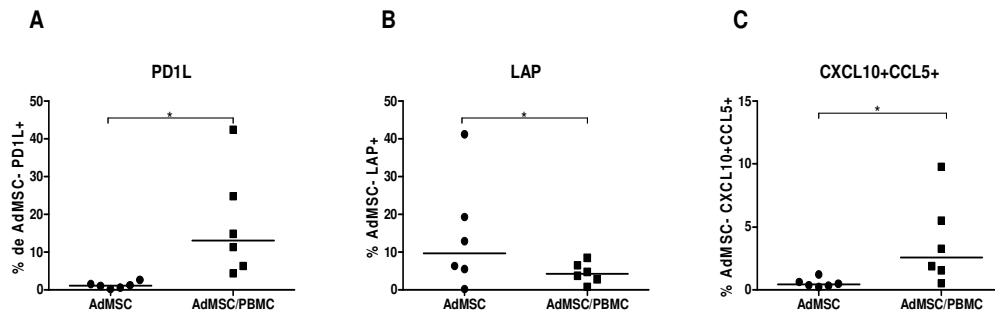


Figura 24- Efeito da interação AdMSC/PBMC nas AdMSC - porcentagem de positividade.

As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1µg/ml) por 3 dias e, posteriormente, as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. AdMSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e AdMSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC, posteriormente as moléculas descritas foram avaliadas sempre dentro da população CD90+. **A**) % de AdMSC PDL1+. **B**) % de AdMSC LAP+. **C**) % de AdMSC CXCL10+CCL5+. LAP: do inglês “*latency-associated peptide*”, TGF-beta de membrana. PDL1: do inglês “*programmed death ligand-1*”, CD90: Thy-; CXCL10: quimiocina IP10 ligante de CXCR3, CCL5: quimiocina RANTES ligante de CCR4 e CCR5. Teste não paramétrico, pareado de Wilcoxon, *p<0,05.

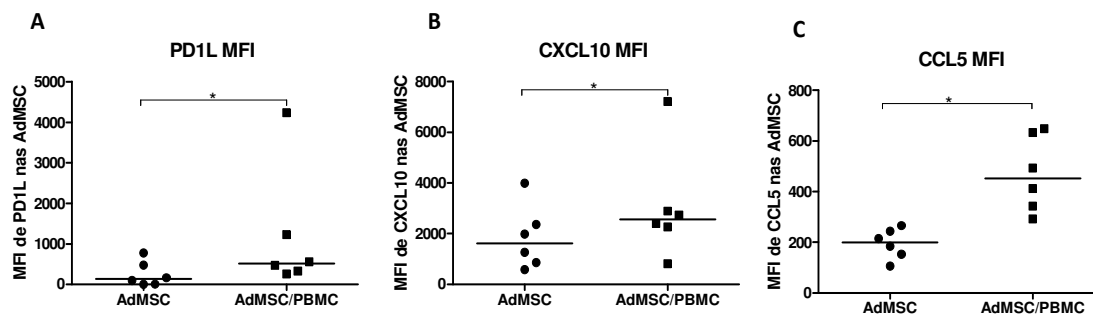


Figura 25 Efeito da interação AdMSC/PBMC nas AdMSC - Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI).

As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1µg/ml) por 3 dias e, posteriormente, as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. AdMSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e AdMSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC, posteriormente as moléculas descritas foram avaliadas sempre dentro da população CD90+. **A**) MFI de PDL1 nas AdMSC. **B**) MFI de CXCL10 nas AdMSC. **C**) MFI de CCL5 nas AdMSC. PDL1: do inglês “*programmed death ligand-1*”, CD90: Thy-1, CXCL10: quimiocina IP10 ligante de CXCR3, CCL5: quimiocina RANTES ligante de CCR4 e CCR5. Teste não paramétrico, pareado de Wilcoxon, *p<0,05.

Nos linfócitos T, observamos, na análise conjunta, um aumento significativo na mediana do número de células T com o fenótipo CD73⁺ dentro das CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, descrito para uma subpopulação de células Treg, tanto nas populações com alta expressão de CD25 (hi) (em média 325% de aumento, variando de 6% a 467%, p=0,0313) quanto naquelas com baixa expressão de CD25 (lo) (em média 342% de aumento, variando de 10% a 427%, p=0,0313), mas não nas células CD25 negativas (**Figura 26**). Também observamos um aumento na intensidade de expressão da molécula CCR7 nas células CD4⁺CD25^{lo}FOXP3⁺ (em média 79% de aumento, variando de 5,5% a 226%, p=0,0156) (**Figura 30**).

Por outro lado, observamos uma diminuição na % de células com o fenótipo CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Totais) (em média 35% de diminuição, variando de 19% a 53%, p=0,0156) e das CD4⁺CD25^{lo}FOXP3⁺ (em média 45% de diminuição, variando de 26% a 61%, p=0,0156), mas não das com alta expressão de CD25 (hi) (**Figura 27**). Também observamos diminuição do número de células de outros fenótipos descritos para determinadas subpopulações de células Treg, como as Treg CXCR3⁺: CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CXCR3⁺ e Treg CCR4⁺CCR5⁺ descritas no contexto do transplante, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CCR5⁺CCR4⁺. Para as Treg CXCR3⁺, houve diminuição do número de células CXCR3⁺ tanto das CD25 totais (em média 59% de diminuição, variando de 31% a 85%) como das CD25^{lo} (em média 69% de diminuição, variando de 54% a 84%), mas não observamos diminuição nas CD25^{hi} (**Figura 28**). Já para as Treg CCR4⁺CCR5⁺ houve diminuição de CCR4 e CCR5 tanto na subpopulação CD25^{hi} (em média 70% de diminuição, variando

de 58% a 73%, $p=0,0156$) como nas CD25^{lo} (em média 65% de diminuição, variando de 57% a 75%, $p=0,0156$) (**Figura 29**).

As subpopulações de linfócitos T CD8+OX40+ também tiveram as % diminuídas após o contato com as AdMSC (em média 85% de diminuição, de 66% a 96%, $p=0,0313$), assim como as CD4+/ICOS+ (em média 52% de diminuição, variando de 19% a 88%, $p=0,0156$), CD8+/ICOS+ (em média 85%, variando de 66% a 81%, $p=0,0313$) (**Figura 31**). Diminuição da intensidade de expressão (MIF) também foi observada para as moléculas ICOS tanto nas células T CD4+ (em média 32%, variando de 2 a 58%, $p=0,0156$) quanto CD8 (em média 43%, variando de 21 a 57%, $p=0,0313$) e de OX40 nas CD8+ (em média 36%, variando de 14 a 55%, $p=0,0313$).

Para todas essas análises o teste estatístico utilizado foi teste t não paramétrico pareado de Wilcoxon.

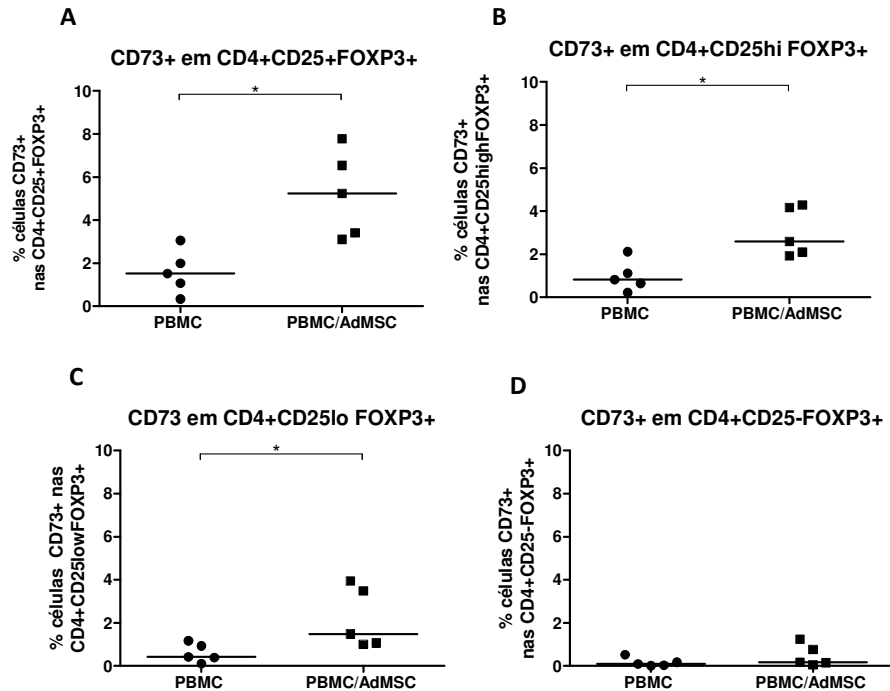


Figura 26- Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - Treg CD73+ - Porcetagem de positividade. As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1 μ g/ml) por 3 dias e posteriormente as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. MSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e MSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC, posteriormente as moléculas descritas foram avaliadas sempre dentro da população CD4+ \rightarrow CD25+ \rightarrow FOXP3+. **A**) %de células CD73+ das CD4+CD25+FOXP3+. **B**) %de células CD73+ das CD4+CD25hiFOXP3+. **C**) %de células CD73+ das CD4+CD25loFOXP3+. **D**) %de células CD73+ das CD4+CD25negFOXP3+. n=5. Teste t pareado de Wilcoxon. *p<0,05

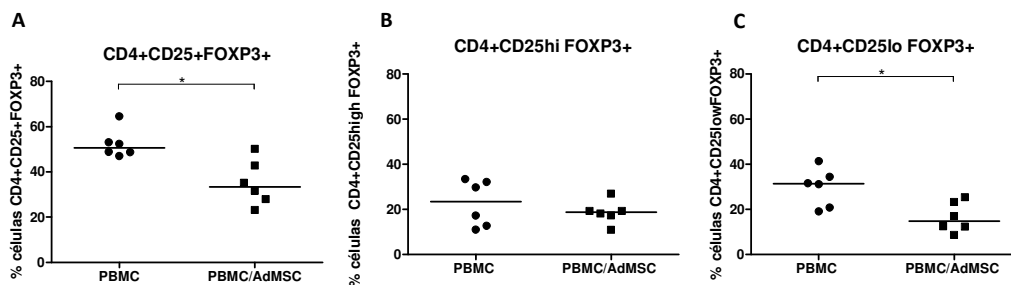


Figura 27 - Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - Treg totais - Porcetagem de positividade. As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1 μ g/ml) por 3 dias e posteriormente as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. MSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e AdMSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC, posteriormente as moléculas descritas foram avaliadas sempre dentro da população CD4+ \rightarrow CD25+. **A**) %de células FOXP3+ das CD4+CD25+ Treg total. **B**) %de células FOXP3+ das CD4+CD25hi. **C**) %de células FOXP3+ das CD4+CD25lo, n=6. Teste t pareado de Wilcoxon. *p<0,05.

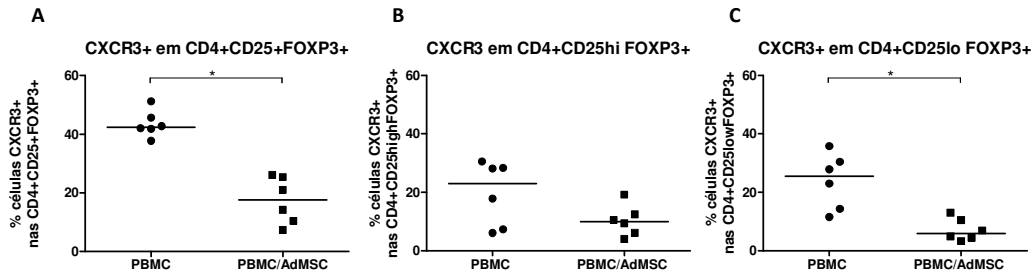


Figura 28- Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - subpopulação Treg CXCR3+ Porcentagem de positividade. As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1 μ g/ml) por 3 dias e posteriormente as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. MSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e AdMSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulidade (SSC), posteriormente as moléculas descritas foram avaliadas sempre dentro da população CD4 \rightarrow CD25 \rightarrow FOXP3 $^+$. **A)** %de células CXCR3 $^+$ das CD4+CD25+FOXP3 $^+$.(Treg CXCR3 $^+$ total) **B)** %de células CXCR3 $^+$ das CD4+CD25hiFOXP3 $^+$. **C)** %de células CXCR3 das CD4+CD25loFOXP3 $^+$, n=6. Teste t pareado de Wilcoxon. *p<0,05. De acordo com o fenótipo as Treg podem migrar diferencialmente, para tanto podem ser chamadas como Treg Th1, de acordo com a expressão do receptor de quimiocina CXCR3, importante para ação a uma resposta do tipo Th1. (Campbell, 2011)

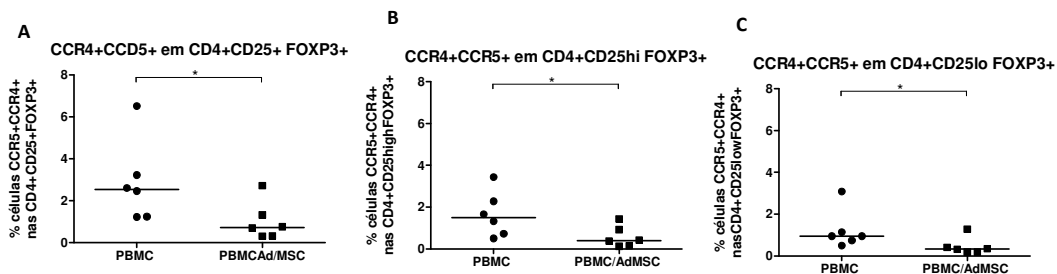


Figura 29- Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC - subpopulação Treg CCR4+CCR5+ - Porcentagem de positividade. As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1 μ g/ml) por 3 dias e posteriormente as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. MSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e AdMSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulidade (SSC), posteriormente as moléculas descritas foram avaliadas sempre dentro da população CD4 \rightarrow CD25 \rightarrow FOXP3 $^+$. **A)** %de células CCR4+CCR5 $^+$ das CD4+CD25+FOXP3 $^+$. (%Treg-Tx total) **B)** %de células CCR4+CCR5 $^+$ das CD4+CD25hiFOXP3 $^+$. **C)** %de células CCR4+CCR5 $^+$ das CD4+CD25loFOXP3 $^+$, n=6. Teste t pareado de Wilcoxon. *p<0,05. De acordo com o fenótipo as Treg podem migrar diferencialmente, para tanto podem ser classificadas de acordo com a expressão do receptor de quimiocina CCR4 e CCR5, importante para ação a uma resposta do tipo Th2 e em resposta a um aloenxerto. (Campbell, 2011)

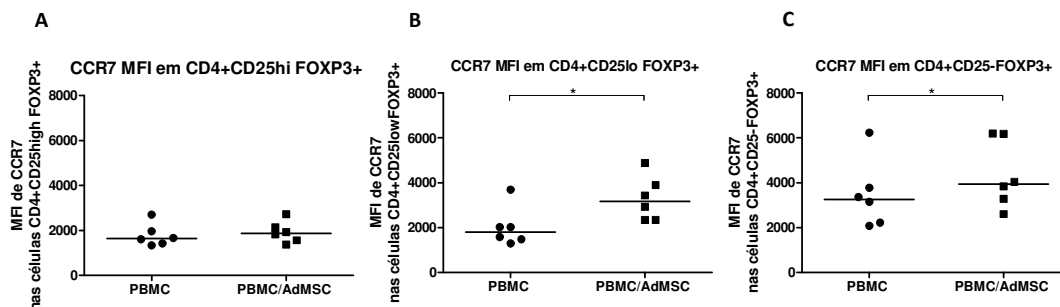


Figura 30- Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC- subpopulação Treg CCR7+ - Mediana de Intensidade de Fluorescência. As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1µg/ml) por 3 dias e posteriormente as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. MSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e AdMSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), posteriormente a MFI de CCR7 foi avaliada sempre dentro da população CD4+ →CD25+→FOXP3+. **A)** MFI de CCR7 das células CD4+CD25+FOXP3+. **B)** MFI de CCR7 das células CD4+CD25hiFOXP3+. **C)** MFI de CCR7 das células CD4+CD25loFOXP3+ , n=6. Teste t pareado de Wilcoxon. *p<0,05. De acordo com o fenótipo as Treg podem migrar diferencialmente, para tanto as classificamos como Treg CCR7+, importante para diferenciação de células de memória e migração e atuação nos linfonodos, *in vivo*. (Campbell, 2011).

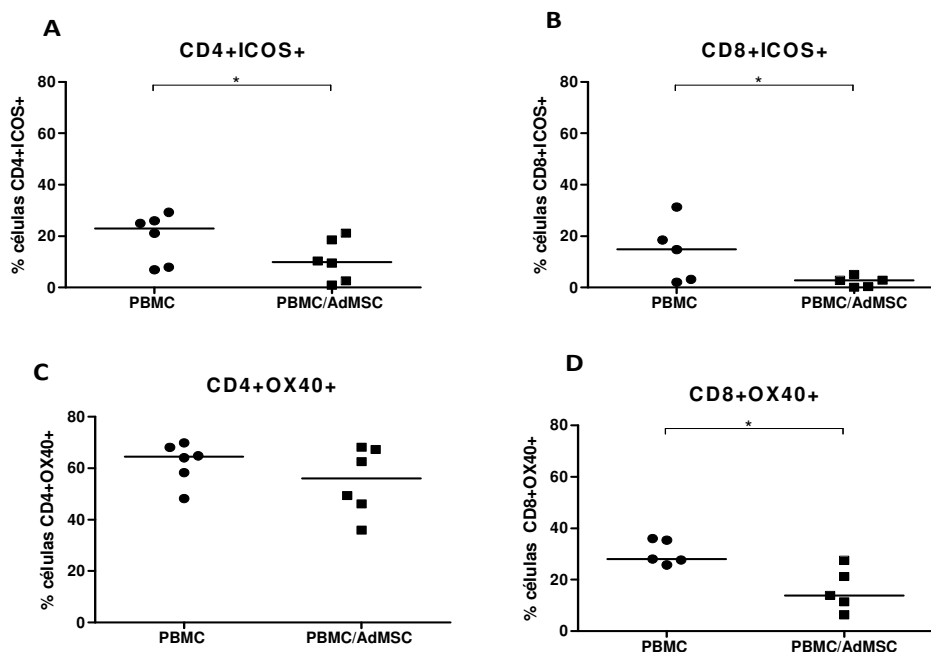


Figura 31- Efeito da interação AdMSC/PBMC nas PBMC- ativação CD4 e CD8- Porcentagem de positividade. As células foram cocultivadas com anti-CD3 (1µg/ml) por 3 dias e posteriormente as AdMSC foram tripsinizadas para avaliação da expressão de proteínas, por citometria de fluxo. AdMSC: AdMSC que foram cultivadas sozinhas com anti-CD3 e MSC/PBMC: cocultura de AdMSC e PBMC estimuladas com anti-CD3. Foram analisados 300.000 eventos na região (R1) de linfócitos selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), posteriormente a % de ICOS e OX40 foi avaliada sempre dentro da população CD4+ e de CD8+. **A)** das CD4+ % células ICOS+. **B)** das CD8+ % células ICOS+. **C)** das CD4+ % células OX40+. **D)** das CD8+ % células OX40+. n=6. Teste t pareado de Wilcoxon. *p<0,05. ICOS: do inglês "*inducible T cell co-stimulator*", OX40: CD134, membro da família dos receptores de TNF.

Analisamos se as modificações significativas em relação à expressão dessas moléculas e das subpopulações celulares eram diferentes nos ensaios com a maior capacidade supressora das AdMSC, nos ensaios de proliferação. Apesar de não ter sido possível realizar o teste exato de Fisher pois tivemos casela de zero na tabela de contingência, observamos que nos ensaios nos quais houve maior supressão houve uma diminuição das células CXCR3+ na população Treg e das células CD4+ICOS+ quando comparado aos ensaios de menor supressão. Observamos também um maior número de células CD73+ na população de células Treg nos ensaios de maior supressão.

4.7 Efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão gênica de um painel de moléculas da resposta imune

O objetivo deste ensaio foi verificar o efeito da interação AdMSC/PBMC na expressão gênica, com um painel de moléculas relacionadas à resposta imune de ambas as células, após coculturas estimuladas com anti-CD3. Verificamos diversas modificações que ocorreram tanto nas AdMSC quanto nos LT, simultaneamente, após interação celular e destacamos as moléculas que foram moduladas de forma dominante. Conforme descrito no delineamento experimental, para diminuir a variabilidade biológica, realizamos os experimentos com as mesmas PBMC e variamos apenas as AdMSC.

Realizamos 8 experimentos de cocultivo (AdMSC x PBMC) utilizando 8 células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de diferentes indivíduos (AdMSC4, AdMSC 5, AdMSC 6, AdMSC 7, AdMSC 9, AdMSC 10, AdMSC 12, AdMSC 14), todas cultivadas com PBMC do mesmo indivíduo (Pe5) e

estimuladas com anti-CD3 solúvel. Para as condições de comparação, sempre utilizamos as células PBMC e AdMSC cultivadas separadamente em meio com anti-CD3. As células ficaram 3 dias em cultura e, posteriormente, foram purificadas por esferas magnéticas, para extração do RNA.

Estudamos moléculas predominantemente com atividade imunorreguladora (REGULA) a pró-inflamatória (INFLAMA) tanto nas AdMSC quanto nos LT.

4.7.1 Validade interna dos experimentos

Todos os experimentos de PCR em tempo real preencheram os critérios de validação de cada etapa, especificados na seção Material e Métodos. Após a extração de RNA, quantificamos as amostras no Nanodrop, e o grau de pureza foi verificado pela relação entre 260 e 280nm. Todas amostras apresentaram uma boa pureza (valores de razão entre 1,8 a 2,0). Posteriormente, corremos um gel de agarose 1%, no qual verificamos a integridade das amostras pela visualização das duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S (**Figura 32**).

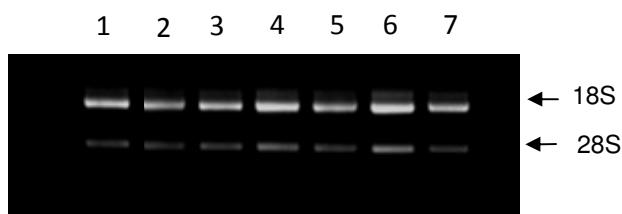


Figura 32- Gel ilustrativo da integridade do RNA após sua extração: É possível visualizar as duas bandas equivalentes às subunidades do ribossomo, 18S e 28S. Amostras corridas em gel de agarose a 1%. As amostras correspondem às condições de cultura: 1) LT purificados da condição só com anti-CD3; 2 e 3) LT purificados da condição cocultivo com AdMSC e anti-CD3; 4 e 6) AdMSC da condição só com anti-CD3; 5 e 7) AdMSC purificadas da condição cocultivo com PBMC e anti-CD3.

Após a síntese do cDNA, como controle desta transcrição, verificamos a expressão do gene endógeno HPRT nas amostras testadas, por PCR (**Figura 33**), antes da reação de PCR em tempo real, e todas as amostras estavam adequadas.

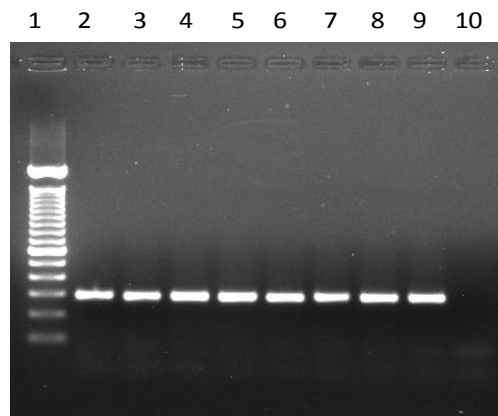


Figura 33- Gel ilustrativo da reação de PCR para HPRT. Foi realizada a reação de PCR para HPRT (*do inglês, "hypoxanthina phosphoribosyl transferase"*), como controle da reação de transcrição de RNA para cDNA. Após eletroforese, em gel de agarose a 1%, observamos da esquerda para a direita: 1) Ladder 100pb; 2 e 6) LT purificados da condição só com anti-CD3; 3 e 7) LT purificados da condição cocultivo com AdMSC e anti-CD3; 4 e 8) AdMSC da condição só com anti-CD3; 5 e 9) AdMSC purificadas da condição cocultivo com PBMC e anti-CD3; 10) Controle negativo, reação realizada com todos reagentes exceto amostra de cDNA.

Para PCR em tempo real, todas as amostras preencheram os critérios de validação: citados na seção Material e métodos. As curvas de dissociação apresentando um pico único podem ser observadas nos anexos (**Figuras 46 e 47**).

4.7.2 Expressão gênica nas AdMSC sozinhas

Todas as AdMSC foram cultivadas sozinhas e no cocultivo com as PBMC, nas mesmas condições das PBMC, sempre estimuladas com anti-CD3. As AdMSC sem o contato com as PBMC tiveram expressão gênica de diversas moléculas (17 das 30 moléculas em todas as 8 AdMSC), após os 3 dias de

cultivo, mesmo de algumas moléculas ainda pouco descritas na literatura como FOXP3, SEMA4D. Vale ressaltar que dentre essas 17 moléculas, há tanto moléculas predominantemente imunorreguladoras (REGULA), quanto predominantemente proinflamatórias (INFLAMA) (**Tabela 13**). No entanto, a intensidade de expressão não pode ser medida, pois temos apenas nos valores de Ct (do inglês *cycle threshold*). Também não foi possível determinar se já havia expressão dessas moléculas antes do estímulo com anti-CD3, pois não analisamos sua expressão sem este estímulo.

4.7.3 Expressão gênica nos LT sem interação com as AdMSC

Todas as PBMC foram cultivadas sozinhas e no cocultivo com as AdMSC, sempre estimuladas com anti-CD3. Os linfócitos T purificados de PBMC estimuladas com anti-CD3, sem o contato com as MSC tiveram expressão gênica de diversas moléculas (19 de 30 em todos os experimentos). Observamos expressão tanto de moléculas predominantemente imunorreguladoras (REGULA), quanto predominantemente proinflamatórias (INFLAMA) (**Tabela 13**). No entanto, a intensidade de expressão não pode ser medida, pois temos apenas nos valores de Ct.

Tabela 13- Expressão gênica nas AdMSC e LT cultivados sozinhos com o estímulo de anti-CD3

Células	Número de experimentos	Genes
AdMSC	8/8	CCL2, CD274, TGFB, HGF, VCAM1, VEGFA, HLAG, LIF, NRP1, PTGS2, HIF1A, RUNX3, TNFA, SEMA4D, POU5F1, THY1, MMP9
	7/8	IDO
	5/8	NOS2, FOXP3, IL13
	3/8	CCL1
	1/8	FASLG, IFN, IL17A
LT	8/8	BCL2, CCR4, CCR8, CTLA4, FOXP3, GATA3, HLAG, IDO, IL10, IL13, IFNG, LGALS1, S1RP1, SOCS3, TGFB, TICAM1, TBX21, IL1R2, RORC, TNFA, NFATC2, CTNNA1, IL9
	6/8	MMP9, MMP2, LRRC32
	4/8	IL1B, TLR10, IL4

Destacamos os genes que tiveram um Ct válido (≤ 35) (portanto expressão detectável) na condição em que cada célula foi cultivada sozinha. Acima, os genes que foram expressos nas AdMSC cultivadas sozinhas com o estímulo de anti-CD3; em cada um dos oito experimentos foram usadas células de um indivíduo diferente. As siglas referem-se aos genes que foram expressos. Abaixo os genes que foram expressos nos LT cultivados sem as AdMSC, e com o estímulo de anti-CD3. Em todos os experimentos as PBMC foram do mesmo indivíduo. As siglas referem-se aos genes que foram expressos. Em vermelho genes predominantemente INFLAMA, em verde os predominantemente REGULA e em preto com outra atividade, OUTROS. Total de genes estudados para cada célula = 30. n=8. AdMSC= células mesenquimais do tecido adiposo; LT: linfócitos T; Ct= *cycle threshold*. Vale destacar que a expressão de FOXP3 e SEMA4D não foi ainda descrita nas AdMSC.

4.7.4 Modificação da expressão gênica após interação AdMSC/PBMC

Analisamos as modificações na expressão gênica, separadamente, nos LT e nas AdMSC purificadas após o cocultivo. As purezas obtidas após a separação com esferas magnéticas variaram de 62% a 84% para as AdMSC e de 70% a 91% para as PBMC.

Para os cálculos da quantificação da expressão relativa de mRNA, utilizamos apenas o gene endógeno GAPDH (do inglês, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), pois a sua expressão se manteve mais homogênea do que o outro gene endógeno, a ACTB (do inglês, *actin beta*) entre todos os experimentos tanto com as AdMSC como com os LT.

Fizemos três tipos de análises dos resultados das modificações de expressão gênica após o cocultivo com as duas subpopulações celulares: i) análise mais global das modificações; ii) análise considerando os tipos de modificação de expressão gênica, REGULA x INFLAMA; iii) análise considerando as interações das modificações na expressão gênica. Todas serão melhor explicadas mais adiante. Lembramos que as AdMSC utilizadas foram de 8 indivíduos diferentes e os LT do mesmo indivíduo para os 8 experimentos realizados.

De uma forma geral, para cada célula mesenquimal estudada observamos modificação da expressão gênica em 75 a 100% dos genes analisados. No entanto, este padrão homogêneo e predominante não foi observado nos LT, mesmo tendo sido usadas PBMC do mesmo indivíduo para os 8 experimentos. Em cada experimento realizado com as diferentes AdMSC, os LT tiveram modificação de expressão gênica em 30 a 76% das moléculas estudadas.

Para facilitar a análise das modificações de expressão gênica, classificamos os genes analisados em predominantemente imunorreguladores e em predominantemente proinflamatórios (**Tabela 14**). Em seguida, de acordo com o valor da quantificação relativa ($QR \geq 2$ expressão relativa aumentada ou $QR \leq 0,5$ expressão relativa diminuída), classificamos as modificações de expressão gênica como sendo REGULA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente imunorreguladoras ou diminuição da expressão de moléculas proinflamatórias) e INFLAMA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente proinflamatórias ou diminuição da expressão de moléculas predominantemente imunorreguladoras).

Tanto nos LT quanto nas AdMSC, algumas modificações foram muito marcantes. Após o cocultivo, observamos **nos LT**, aumento de IDO em todos os experimentos (QR: 5 a 36; mediana 15,79), um gene sabidamente relacionado à resposta imunorreguladora. Também observamos um aumento de IL1B muito grande, (QR: 584 a 14910; mediana de 1892), inclusive com induções (sem expressão na condição das PBMC sozinhas estimuladas com anti-CD3 e com expressão após o contato com as AdMSC) em 4 de 8 experimentos, molécula esta relacionada principalmente à indução da resposta próinflamatória. **Já nas AdMSC**, nos chamou a atenção o aumento e a indução de expressão de um grande número de moléculas (21 dos 30 genes estudados). Os que mais se destacaram em intensidade foram: um gene predominantemente imunorregulador e outro próinflamatório: a IDO (QR: 7141 a 38.000; mediana de 7354) e o IFNG (QR: 341 a 43.387; mediana de 1159) respectivamente.

Tabela 14 – Classificação dos genes quanto predominantemente imunorreguladores e próinflamatórios

Moléculas predominantemente	AdMSC	LT
Imunorreguladoras	CCL1, CCL17, CCL2, CCL22, CD274, VCAM1, VEDFA, TGFB, FOXP3, HGF, HLAG, IDO, IL10, IL13, IL4, LIF, NOS2, NRP1, PTGS2, HIF1A, FASLG	S1RP1, SOCS3, CCR4, CCR8, CTLA4, FOXP3, GATA3, HLAG, IDO, IL10, IL13, IL4, LGALS1, TLR10, TICAM1, TGFB1, IL9, CTNNB1, LRRC32
Próinflamatórias	SEMA4D, RUNX3, IL12B, IFNG, IL17A, TNFA	RORC, TNF, IFNG, IL1B, IL1R2, RUNX3, TBX21

Os genes cuja expressão foi avaliada por PCR em tempo real, nas AdMSC e nos LT, foram classificados de acordo com sua função predominante: imunorreguladores ou próinflamatórios.

4.7.5 Análise global

Nesta primeira análise consideramos todos os experimentos em conjunto e analisamos quais as moléculas que tiveram a mediana de expressão relativa (QR) acima ou abaixo dos pontos considerados para aumento (≥ 2) ou diminuição da expressão ($\leq 0,5$) em relação à condição sem interação entre as duas populações celulares.

Para as AdMSC o tipo de modificação mais dominante foi aumento da expressão gênica. Das 30 moléculas estudadas 21 tiveram aumento da expressão gênica, considerando a mediana de QR dos experimentos com valores acima de 2 (**Figura 34**). Encontramos uma grande variação na intensidade de aumento entre as moléculas. Por exemplo, o aumento da expressão de IDO variou de QR: 7141 a 38.000; enquanto de IL10 variou de QR: 7,16 a 45,25 (**Tabela 15**).

Das 20 moléculas predominantemente imunorreguladoras estudadas, observamos diminuição da sua expressão em apenas uma, TGFB (QR: 0,45 a 0,14; mediana de 0,40). Por outro lado, houve aumento ou indução de expressão em 15 moléculas imunorreguladoras, dentre elas, os genes CCL1, CCL17, CCL22, IL10 e FASLG apresentaram indução de expressão em quase todos os experimentos (**Figura 36**). Para VEGF, HGF e NRP1, não observamos modificação da expressão gênica (**Figura 34**). Já para os genes classificados como proinflamatórios, também observamos, em sua maioria, aumento (RUNX3 - QR: 16,34 a 919,05; mediana de 347,60; TNFA - QR: 12,04 a 480,37; mediana de 76,62) e indução (IFNG - QR: 341 a 43.387; mediana de 1159,10). Para outros genes proinflamatórios como, IL17 e IL12B, não foi detectada expressão gênica, nem antes, nem depois do cocultivo (**Figura 34**). É interessante

salientar, que dentre os genes classificados como “outros”, observamos diminuição da expressão do THY1 (CD90) (QR: 0,35 a 0,09; mediana = 0,15).

Assim, nesta análise, apesar de observamos aumento tanto de genes imunorreguladores quanto proinflamatórios, o tipo de modificação de expressão gênica mais dominante foi REGULA (razão REGULA/ INFLAMA = 2,72). Para fazermos este cálculo contamos a modificação de expressão para cada gene em cada experimento (**Figura 36**).

Para os LT, as modificações de expressão gênica não foram tão homogêneas quanto nas AdMSC, apesar das PBMC dos mesmo indivíduo terem sido usadas para todos os experimentos. Considerando a mediana de expressão relativa dos experimentos, o tipo de modificação mais dominante observada foi o aumento (mediana de QR acima de 2). Das 30 moléculas estudadas, 12 (BCL2, CTLA4, FOXP3, IDO, IL4, TLR10, SOCS3, LRRC32, IL1B, MMP2, MMP9 e IL9) tiveram aumento da sua expressão (**Figura 35**), e nas outras 18 não houve modificação.

Nos LT também observamos uma grande variabilidade na intensidade de aumento de expressão relativa das moléculas. Por exemplo, a IDO teve expressão gênica relativa que variou de 5,84 a 36,15; enquanto a IL1B, variou de 584 a 14910 (**Tabela 16**).

Das 18 moléculas predominantemente imunorreguladoras estudadas, houve aumento ou indução em 8 (**Tabela 16**). Dentre elas, os genes IDO, TLR10, LRRC32, foram os que mais se comportaram de forma dominante entre todos os experimentos (**Figura 37**). Já para os genes classificados como predominantemente proinflamatórios, observamos apenas aumento de expressão em um dos 7 genes, a IL1B (QR: 584 a 14910; mediana=1892,21).

É interessante salientar, que dentre os genes classificados como outros (outras funções) observamos aumento de MMP9 (QR: 2,03 a 4,85; mediana= 2,52) e MMP2 (QR: 310 a 3044; mediana = 714,43).

Assim, nesta análise, apesar de observamos aumento de expressão tanto de genes imunorreguladores quanto proinflamatórios, o perfil dominante de modificação foi REGULA (razão REGULA/ INFLAMA = 5,50)

Tabela 15- Principais genes com modificação da sua expressão nas AdMSC, após cocultura com PBMC

Gene	Função predominante	Modificação	Faixa de valores de expressão relativa (QR)	Mediana expressão relativa	Tipo de modificação
CCL1	Regula	Aumento e Indução	6,8 a 65,48	19,9	REGULA
CCL17	Regula	Indução	2,26 a 21,50	5,3	REGULA
CCL2	Regula	Aumento	11 a 84,82	31,84	REGULA
CCL22	Regula	Aumento e Indução	35 a 1938	350,65	REGULA
CD274	Regula	Aumento	92,80 a 520,95	329,11	REGULA
FOXP3	Regula	Aumento e Indução	2,26 a 16,30	4,66	REGULA
HLA G	Regula	Aumento	4,59 a 12,17	7,31	REGULA
IDO	Regula	Aumento e Indução	7141 a 38.000	7354,21	REGULA
IL10	Regula	Indução	7,16 e 45,25	13,07	REGULA
LIF	Regula	Aumento	17,67 a 150,44	32,44	REGULA
NOS2	Regula	Aumento e Indução	5,03 a 49,15	14,16	REGULA
PTGES2	Regula	Aumento	65,71 a 507,06	241,12	REGULA
VCAM1	Regula	Aumento	2,44 a 35,48	6,79	REGULA
FASLG	Regula	Aumento	51 a 1352,58	470,15	REGULA
TGFb	Regula	Diminuição	0,45 a 0,14	0,4	INFLAMA
SEMA4D	Inflama	Aumento	15,33 a 156,82	67,79	INFLAMA
IFNG	Inflama	Indução	341 a 43.387	1159,1	INFLAMA
RUNX3	Inflama	Aumento	16,34 a 919,05	347,6	INFLAMA
TNFA	Inflama	Aumento	12,04 a 480,37	76,62	INFLAMA
POU5F1	Outros	Aumento	2,05 a 11,94	3,43	
MMP9	Outros	Aumento	4,37 a 75,85	35,91	
THY1	Outros	Diminuição	0,35 a 0,09	0,15	

Genes cuja expressão foi modificada nas AdMSC após cocultivo com as PBMC e estímulo de anti-CD3 após 3 dias de cocultivo. Em verde estão os genes com função predominantemente imunorreguladora (Regula), sombreados em vermelho aqueles com função predominantemente proinflamatória (Inflama) e sombreados de cinza claro, com outra função (Outros). A modificação de expressão gênica foi classificada como aumento quando a mediana da expressão relativa de mRNA foi ≥ 2 ou diminuição quando a expressão relativa de mRNA foi $\leq 0,5$. Indicamos a presença de induções quando não houve expressão gênica na condição fora do cocultivo e houve apenas expressão gênica após o contato com as PBMC. Todos os valores foram normalizados com a expressão do gene endógeno GAPDH.

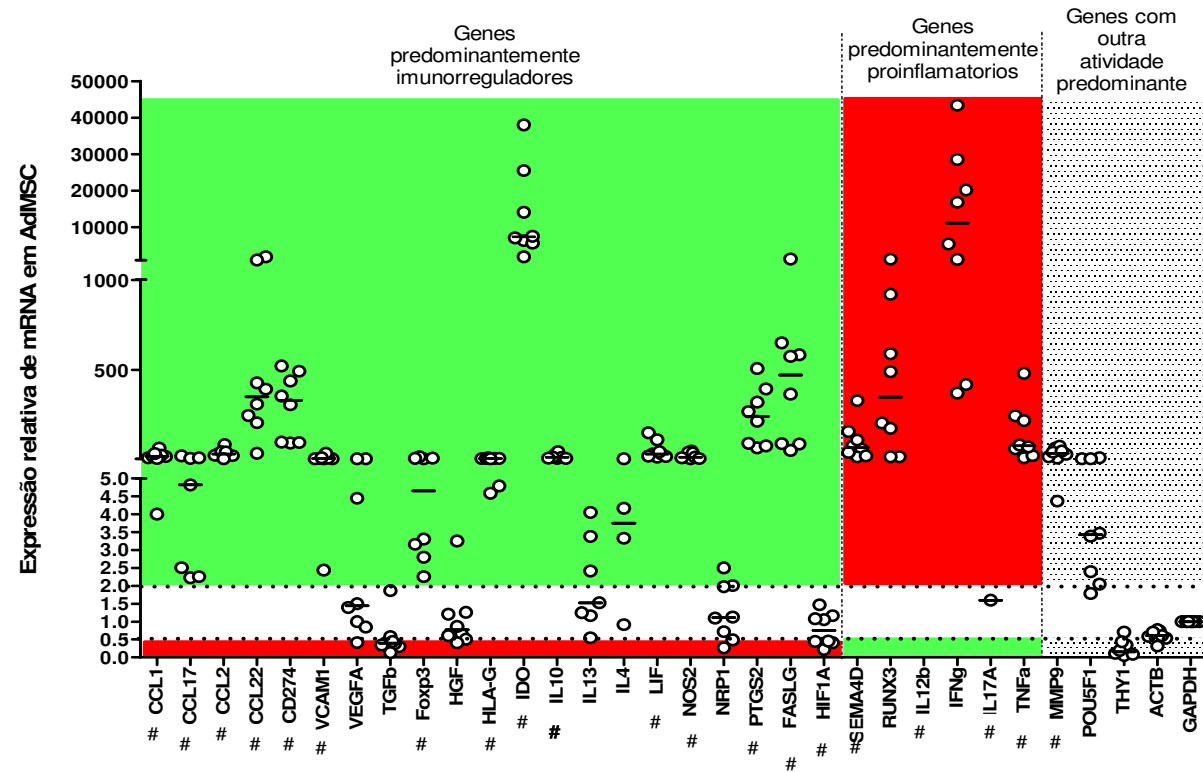


Figura 34 – Quantificação relativa da expressão de mRNA nas AdMSC após o cocultivo com as PBMC estimuladas com anti-CD3 - Os 30 genes analisados foram classificados em REGULA, INFLAMA e OUTROS de acordo com sua função predominante. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o GAPDH como endógeno normalizador. O índice de expressão relativa foi calculado relativamente à expressão gênica nas células cultivadas com anti-CD3, sem o contato com as PBMC. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica ($QR \leq 0,5$) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa ($QR \geq 2,0$). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas ($QR: >0,5; <2$). Quando o Ct do controle foi indetectável ou mesmo quando o valor determinado foi maior que 35, nos utilizamos de uma estratégia indicada pelo próprio programa de análise fornecida online pela SABiosciences para quantificarmos as induções: substituímos os valores desses Ct por 35 (que é o valor limite máximo considerado de detecção de expressão gênica, pelos critérios de validação). Verificar na **(Figura 36)** quais moléculas tiveram sua expressão gênica induzida. Todos experimentos foram realizados com AdMSC diferentes e as mesmas PBMC. AdMSC= Células mesenquimais de tecido adiposo. $n=8$. Considerando a mediana dos experimentos, em verde modificações do tipo REGULA, em vermelho INFLAMA e em pontilhado outras modificações. **Razão regula/inflama = 2,72.**

Tabela 16 - Principais genes com modificação da sua expressão nos LT, após cocultura com AdMSC

Gene	Função predominante	Modificação	Faixa de valores de expressão relativa (QR)	Mediana expressão relativa	Tipo de modificação
IDO	Regula	Aumento	5 a 36	15,79	REGULA
TLR10	Regula	Aumento e Indução	1,72 a 20	4,13	REGULA
BCL2	Regula	Aumento	0,82 a 6,53	2,07	REGULA
CTLA4	Regula	Aumento	1,35 a 4,54	2,36	REGULA
FOXP3	Regula	Aumento	0,67 a 9,11	3,48	REGULA
IL4	Regula	Indução	1,06 a 22,73	4,14	REGULA
SOCS3	Regula	Aumento	1,21 a 10,79	3,16	REGULA
LRRC32	Regula	Aumento e Indução	1,33 a 7,47	3,24	REGULA
IL9	Regula	Aumento	1,37 a 6,02	6,31	REGULA
IL1B	Inflama	Aumento e Indução	584 a 14910	1892,21	INFLAMA
MMP2	Outros	Aumento e Indução	310 a 3044	714,43	
MMP9	Outros	Aumento e Indução	1,29 a 4,85	2,52	

Genes cuja expressão foi modificada nos LT após cocultivo com as AdMSC e estímulo de anti-CD3 após 3 dias de cocultivo. Em verde estão os genes com função predominantemente imunorreguladora (Regula), sombreados em vermelho aqueles com função predominantemente próinflamatória (Inflama) e sombreados de cinza claro, com outra função (Outros). A modificação de expressão gênica foi classificada como aumento quando a mediana da expressão relativa de mRNA foi ≥ 2 ou diminuição quando a expressão relativa de mRNA foi $\leq 0,5$. Indicamos a presença de induções quando não houve expressão gênica na condição fora do cocultivo e houve apenas expressão gênica após o contato com as AdMSC. Todos os valores foram normalizados com a expressão do gene endógeno GAPDH. No entanto há experimentos cuja expressão gênica não foi modificada (o valor de expressão relativa encontra-se entre 0,5 e 2,0), e é por isso que há alguns valores menos da faixa de expressão relativa que são menores do que 2,0.

4.7.6 Análise REGULA x INFLAMA

Como mostrado anteriormente, tanto os LT como as AdMSC apresentaram um maior número de modificações do tipo REGULA. A razão REGULA/INFLAMA foi maior que 1,0 em todos os experimentos, variando de 2,5 a 13 nos LT (**Figura 37**) e de 2,0 a 4,25 nas AdMSC (**Figura 36**). Dessa forma, com este tipo de análise pudemos, mais uma vez, observar a dominância da modulação da expressão de genes relacionados à resposta imunorreguladora em ambos os tipos celulares após o cocultivo. Esses números também nos mostram a maior heterogeneidade de efeito das AdMSC nos LT. Outro ponto a ser detalhado é o número maior de condições nos LT nas quais

os genes tiveram expressão inalterada (121) (em amarelo na **Figura 37**) contra 5,4 vezes menos nas AdMSC (28) (em amarelo na **Figura 36**).

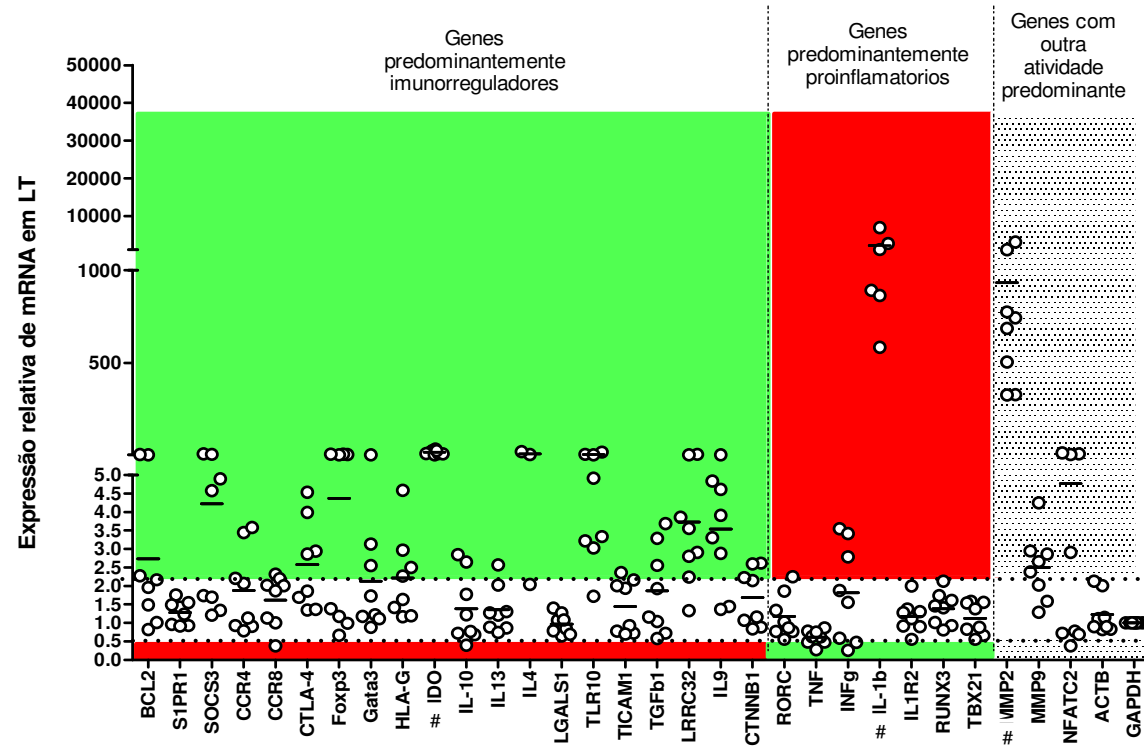


Figura 35- Quantificação relativa da expressão de mRNA nos LT após o cocultivo com as AdMSC- Os 30 genes analisados foram classificados em REGULA, INFLAMA e OUTROS de acordo com sua função predominante. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o GAPDH como endógeno normalizador. O índice de expressão relativa foi calculado relativamente à expressão gênica nas células cultivadas com anti-CD3, sem o contato com as PBMC. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica ($QR \leq 0,5$) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa ($QR \geq 2,0$). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas ($QR: >0,5; <2$). Todos experimentos foram realizados com AdMSC diferentes e as mesmas PBMC. AdMSC= Células mesenquimais de tecido adiposo. $n=8$. Quando o Ct do controle foi indetectável ou mesmo quando o valor determinado foi maior que 35, nos utilizamos de uma estratégia indicada pelo próprio programa de análise fornecida online pela SABiosciences, para quantificarmos as induções: substituímos os valores desses Ct por 35 (que é o valor limite máximo considerado de detecção de expressão gênica, pelos critérios de validação). Verificar na **Figura 37** quais moléculas tiveram sua expressão gênica induzida. Todos experimentos foram realizados com AdMSC diferentes e as mesmas PBMC. Temos apenas 3 pontos no gráfico para IL4 pois em 5 experimentos não houve expressão gênica quantificável. AdMSC= Células mesenquimais de tecido adiposo. $n=8$. Considerando as medianas, em verde modificações do tipo REGULA, em vermelho INFLAMA e em pontilhado outras modificações. **Razão regula/inflama = 5,50.**

	Genes	EXP8	EXP2	EXP12	EXP4	EXP3	EXP5	EXP7	EXP10	Mediana
Endo	ACTB	1,10	0,59	0,74	0,54	0,32	0,78	0,61	0,71	0,66
	GAPDH	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Regula	CCL1	17,46	12,17	65,48	19,90	4,00	26,80	6,82	35,33	18,68
	CCL17	4,82	2,51	21,50	2,23	Undet.	7,63	2,26	9,87	4,82
	CCL2	36,05	24,92	27,63	84,82	44,48	22,86	43,68	6,11	31,84
	CCL22	392,62	428,16	1938,87	308,69	35,58	245,40	205,71	1012,00	350,65
	CD274	492,51	520,95	92,80	353,36	304,86	97,68	437,00	95,54	329,11
	VCAM1	5,19	7,50	6,08	9,63	35,48	5,43	11,57	2,44	6,79
	VEGFA	5,92	1,50	0,42	5,64	1,00	0,85	4,45	1,40	1,45
	TGFB	1,87	0,31	0,39	0,41	0,14	0,35	0,59	0,45	0,40
	FOXP3	3,31	6,00	16,30	8,73	3,16	8,15	2,26	2,80	4,66
	HGF	3,25	1,21	0,61	1,26	0,67	0,87	0,51	0,41	0,77
	HLA-G	7,47	4,59	7,15	7,90	12,17	8,51	5,33	4,79	7,31
	IDO	25531,66	37994,42	14120,47	6365,24	5669,48	1925,48	7566,97	7141,44	7354,21
	IL10	28,29	21,54	45,25	7,16	12,54	13,60	7,92	8,70	13,07
	IL13	1,17	2,42	3,38	1,25	0,55	4,05	1,53	Undet.	1,53
	IL4	Undet.	5,18	4,17	Undet.	Undet.	3,33	0,92	Undet.	3,75
	LIF	110,89	33,17	14,52	150,44	31,71	17,67	43,90	20,31	32,44
	NOS2	14,05	49,15	41,53	5,03	37,63	10,53	14,28	6,66	14,16
	NRP1	2,50	1,13	0,27	2,01	1,10	0,49	1,98	0,72	1,12
	PTGS2	214,82	393,99	65,71	267,43	507,06	76,74	320,46	91,27	241,12
	HIF1A	1,17	1,06	0,23	1,08	0,41	0,45	1,47	0,46	0,76
FASLG	365,06	649,87	1352,58	87,67	51,63	583,26	89,57	575,23	470,15	
Inflama	SEMA4D	328,90	77,17	156,82	58,40	15,33	110,20	21,87	40,53	67,79
	RUNX3	16,34	589,15	205,07	173,77	490,12	919,05	16,48	1252,85	347,60
	IL12B	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.
	IFNG	16879,68	28565,77	43387,75	418,19	5438,53	20185,06	371,44	1196,00	11159,10
	IL17A	Undet.	1,60	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	1,60
	TNFA	244,55	60,97	480,37	12,04	82,03	217,97	22,42	71,21	76,62
Outros	MMP9	63,73	9,79	75,85	17,04	42,36	29,47	4,37	48,00	35,91
	POU5F1	6,11	11,94	3,47	3,39	2,40	2,05	1,79	5,88	3,43
	THY1	0,71	0,11	0,06	0,35	0,11	0,20	0,44	0,09	0,15
Razão REGULA/ INFLAMA Inibição da proliferação		4,25	3,20	2,00	3,20	2,17	2,29	3,75	2,00	2,72
		36%	39%	40%	46%	63%	76%	78%	87%	

Figura 36 - Resultados das modificações da expressão gênica nas AdMSC após o cocultivo. Análise da expressão gênica de diferentes AdMSC purificadas que foram cultivadas por 3 dias com PBMC derivadas de um mesmo indivíduo. Aumentos na QR foram preenchidos de azul QR \geq 2,0) e reduções foram preenchidas de rosa (QR \leq 0,5), assim como as induções estão representadas pelas células circundadas por linha preta mais escura. Nas modificações do tipo REGULA o número está em verde (\uparrow expressão gene predominantemente imunorregulador ou \downarrow expressão gene predominantemente inflamatório) ou do tipo INFLAMA, o número está em vermelho (\uparrow expressão gene predominantemente inflamatório ou \downarrow expressão gene predominantemente imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA. EXP= experimento, Undet= expressão relativa não quantificada. Incluímos nesta figura os dados de intensidade da capacidade supressora exercida pelas AdMSC em cada ensaio de proliferação. Não observamos uma relação entre o balanço da razão REGULA/INFLAMA (2,72) nas AdMSC com uma maior capacidade supressora.

	Genes	EXP8	EXP2	EXP12	EXP4	EXP3	EXP5	EXP7	EXP10	Mediana
Endo	GAPDH	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	ACTB	2,01	1,11	0,82	0,83	1,15	0,90	0,90	2,13	1,00
Regula	BCL2	1,96	5,61	0,82	2,17	6,53	1,01	1,49	2,28	2,07
	S1PR1	1,43	1,76	0,93	1,24	1,55	0,96	0,92	1,49	1,34
	SOCS3	4,90	10,79	1,34	1,74	7,59	1,70	1,21	4,58	3,16
	CCR4	2,07	3,45	0,93	0,91	3,58	1,13	0,79	2,21	1,60
	CCR8	2,32	2,20	2,02	1,00	2,01	1,13	0,38	1,87	1,94
	CTLA-4	2,94	4,54	1,35	1,69	3,99	1,37	1,86	2,86	2,36
	FOXP3	7,00	9,11	1,18	0,99	5,58	1,39	0,67	9,05	3,48
	GATA3	1,73	5,24	0,88	1,18	3,14	1,22	1,11	2,55	1,48
	HLA-G	1,42	2,27	1,17	2,50	4,59	1,19	2,97	1,64	1,95
	IDO	29,00	19,40	12,18	5,84	36,15	11,72	10,73	27,28	15,79
	IL10	0,72	1,22	0,68	1,78	2,65	0,77	2,85	0,40	1,00
	IL13	0,86	2,03	0,89	1,21	2,57	1,31	1,27	0,74	1,24
	IL4	Undet.	6,24	22,63	Undet.	1,06	2,04	Undet.	Undet.	4,14
	LGALS1	1,07	0,65	1,40	0,85	0,69	1,27	0,79	1,08	0,96
	TLR10	3,34	3,03	20,48	7,94	1,72	4,92	3,22	5,72	4,13
	TICAM1	2,36	1,94	0,72	0,93	2,01	0,78	0,70	2,16	1,43
	TGFB1	3,29	2,56	1,04	0,72	1,93	1,16	0,58	3,69	1,54
	IL9	4,61	6,02	2,88	1,45	3,91	4,84	3,31	1,37	3,61
CTNNA1	2,62	2,15	1,07	0,89	2,23	1,16	0,84	2,60	1,65	
LRRC32	2,91	3,56	7,47	1,33	3,86	2,80	2,24	5,71	3,24	
Inflama	RORC	1,86	1,34	0,77	0,56	1,03	0,87	0,77	2,25	0,95
	TNF	0,48	0,48	0,62	0,78	0,63	0,87	0,75	0,28	0,63
	IFNG	1,88	3,55	1,56	0,47	2,79	3,42	0,26	0,59	1,72
	ILB	1072,68	890,83	863,47	14.910,08	6893,40	584,07	5.449,85	2711,73	1892,21
	IL1R2	0,90	0,92	1,11	1,38	1,31	1,28	2,00	0,56	1,19
	RUNX3	1,74	1,41	1,01	1,61	2,13	0,93	0,81	1,46	1,44
	TBX21	1,59	1,54	0,66	0,83	1,56	0,88	0,56	1,38	1,13
Outros	MMP2	330,16	1053,52	328,33	742,89	3044,52	506,00	774,43	685,97	714,43
	MMP9	1,59	2,66	4,25	1,29	2,03	2,38	2,86	2,95	2,52
	NFATC2	10,73	7,14	0,78	0,69	2,91	0,72	0,38	14,83	1,85
	REGULA/ INFLAMA	13,00	8,50	6,00	5,00	5,00	2,50	3,50	4,33	5,50
	Inibição da proliferação	36%	39%	40%	46%	63%	76%	78%	87%	

Figura 37- Resultados das modificações da expressão gênica nos LT após o cocultivo em cada experimento. Análise da expressão gênica dos LT purificados que foram cultivados por 3 dias com AdMSC derivadas de diferentes indivíduos. Aumentos na QR foram preenchidos de azul QR \geq 2,0) e reduções foram preenchidas de rosa (QR \leq 0,5), assim como as induções estão representadas pelas células circundadas por linha preta mais escura. Nas modificações do tipo REGULA o número está em verde (\uparrow expressão gene predominantemente imunorregulador ou \downarrow expressão gene predominantemente inflamatório) ou do tipo INFLAMA, o número está em vermelho (\uparrow expressão gene predominantemente inflamatório ou \downarrow expressão gene predominantemente imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA. EXP= experimento, Undet= expressão relativa não quantificada. Incluímos nesta figura os dados de intensidade da capacidade supressora exercida pelas AdMSC em cada ensaio de proliferação. Não observamos uma relação entre o balanço da razão REGULA/INFLAMA (5,50) nos LT com uma maior capacidade supressora das AdMSC.

4.7.7 Análise das interações entre as modificações da expressão gênica

Encontramos correlações entre modificações de expressão de mRNA que foram compartilhadas entre os experimentos em que observamos maior (>50%) e menor (<50%) supressão da proliferação), tanto para os LT (**Figura 38**) quanto para as AdMSC (**Figura 39**). Dentre as modificações compartilhadas destacamos algumas entre os genes que foram predominantemente expressos (em todos os experimentos), assim como desses com outros genes não predominantemente modificados.

Para os **LT** observamos correlação entre MMP2, IDO e IL1B e entre IDO e MMP2, FOXP2, CTNNB1 e LRRC32 (**Figura 38**).

Para as **AdMSC** observamos correlações compartilhadas entre os experimentos, entre quase todos os genes cuja expressão de mRNA foi predominantemente modificada (**Figura 39**). Destacamos que SEMA4D correlacionou-se com todas as moléculas predominantemente modificadas: CCL1, CCL2, CCL22, CD274, FASLG, FOXP3, HLAG, IDO, IFN, IL10, LIF, NOS2, POU5F1, PTGS2, RUNX3, além de IL10 e CD274 e entre HLAG e IDO.

Encontramos correlações exclusivas nos experimentos em que observamos maior ou menor supressão da proliferação entre diversas modificações da expressão gênica tanto nos LT (**Figuras 40 e 41**) como nas AdMSC (**Figuras 42 e 43**).

No grupo de experimentos nos quais detectamos maior supressão de proliferação (>50%), observamos, nos **LT**, um número maior de genes com

correlações exclusivas entre as modificações de expressão gênica do que nos ensaios com menor capacidade supressora ($p=0,020$). Dentre os 30 genes estudados, apenas 4 (TLR10, TNF, IFNG e IL9) não apresentaram correlações exclusivas de modificação de expressão gênica, no grupo de experimentos com maior supressão. Já no grupo de experimentos com menor capacidade supressora, tivemos 10 genes sem qualquer correlação exclusiva entre as modificações de sua expressão (**Figura 44**). Destacamos nos LT as seguintes correlações de modificação de expressão gênica no grupo de maior capacidade supressora, que poderão nos trazer sugestões de mecanismos dominantes para a imunossupressão. Por exemplo, observamos correlação entre a modificação de expressão de CCR8 e BCL2, CCR4, FOXP3, GATA, IL4, NFATC2, SOCS3, TGFB, TICAM1; entre IL4 e LGALS1, LRR31, MMP9, SOCS3, TGFB1, BCL2, CCR8, FOXP3, GATA, HLAG, IDO e entre CCR4, CTNNB1, IL13, IL1B, IL4, LRR32, S1PR1 (**Figura 44**).

Já nas **AdMSC**, dentre os 30 genes estudados, apenas 3 (HGF, IL12b, IL17A) não apresentaram correlações exclusivas de modificação de expressão gênica, em nenhum dos dois grupos de ensaios com maior ou menor capacidade supressora; outros 3 genes (CCL22, IL13 e TNF α) mostraram correlações entre outros genes apenas no grupo de experimentos nos quais detectamos maior supressão de proliferação (>50%).

Da mesma forma que mostrado para os LT, podemos destacar algumas correlações simultâneas entre moléculas com modificação de expressão gênica nas AdMSC, que podem estar relacionados com maior capacidade

inibitória. Por exemplo, entre CCL17 e CD274, HLAG, LIF, NOS, PTGS2; entre TNFA e HLAG, LIF, MMP9; entre VCAM1 e IDO e RUNX3 (**Figura 45**).

Correlação expressão gênica (LT) compartilhada nos ensaios < supressão > supressão	bd2	ccr4	ccr8	ctla_4	ctmb1	foxp3	gata3	Na_g	ido	il_10	il13	il_1b	il12	il4	il9	ifn	lgals1	lrnc32	mmp2	mmp9	nfatc2	roc	runx3	s1pr1	socs3	tbx21	tgfb1	ticam1	tr10	trf	
bd2	1																														
ccr4	0,8810** 0,9524***	1																													
ccr8			1																												
ctla_4	0,8095* 0,8895*	0,7143* 0,7381*		1																											
ctmb1	0,7619* 0,7619*	0,8333* 0,8095*			1																										
foxp3	0,9048** 0,9742*** 0,9762***	0,8810** 0,9763*** 0,9048**		0,7381* 0,7619* 0,7381*	0,7857* 0,7857* 0,7381*	1																									
gata3	0,9762*** 1,0000***	0,9048** 0,9524***		0,7619* 0,8095*	0,7381* 0,7619*	0,9524*** 1																									
na_g	0,8571** 0,9048**	0,7857* 0,9048**		0,8095* 0,8095*	0,8571** 0,8571**	0,8095* 0,8095*	1																								
ido	0,8333* 0,9048**	0,7619* 0,8333*		0,9048** 0,9524***	0,8810** 0,8333*	0,9048** 0,8571**	0,8571** 0,8810**	1																							
il_10									1																						
il13	0,8571** 0,9286***	0,9286*** 0,9524***				0,8810** 0,9048**	0,9286*** 0,9286***		0,7619* 0,8095*	1																					
il_1b												1																			
il12													1																		
il4														1																	
il9															1																
ifn																1															
lgals1																	1														
lrnc32	0,7381* 0,9286***	0,8095* 0,8810**		0,7143* 0,9048**	0,7857* 0,8810**	0,8810** 0,9048**	0,8333* 0,7857*	0,9048** 0,9762***		0,8571** 0,8333*									1												
mmp2				0,7143* 0,8095*	0,7857* 0,8810**	0,8333* 0,8095*	0,7857* 0,8333*	0,8571** 0,8571**				0,9286*** 0,9286***							1												
mmp9	0,8095* 0,8571**		0,8024* 0,8571**			0,9048** 0,8333*	0,8571** 0,8571**	0,9048** 0,9048**				0,8333* 0,8571**	0,8333* 0,7857*	1																	
nfatc2	0,9524*** 0,8810**	0,9286*** 0,8810**				0,9762*** 0,9048**	0,9762*** 0,8810**	0,7857* 0,7381*				0,9048** 0,8095*		0,8333* 0,7857*	1																
roc	0,8571** 0,8095*	0,8333* 0,7857*		0,8024* 0,9048**		0,9048** 0,8333*	0,9048** 0,8095*	0,9048** 0,7143*																							
runx3	0,8810** 0,8810**			0,8571** 0,8333*	0,7857* 0,8333*	0,8333* 0,9048**	0,8333* 0,8810**	0,9762*** 0,9286***						0,7143* 0,8571**	0,8810** 0,7857*	0,8095* 0,8095*	0,8095* 0,8095*	0,8333* 0,7857*	1												
s1pr1	0,8333* 0,7381*	0,8571** 0,7857*		0,9286*** 0,9524***	0,9524*** 0,9762***	0,7381* 0,7619*	0,7857* 0,7381*	0,8095* 0,8095*				0,8333* 0,7857*	0,7381* 0,8095*	0,8095* 0,8095*	0,8810** 0,8095*	0,8571** 0,8571**	0,8810** 0,8571**	0,9048** 0,9048**	0,7857* 0,8095*	0,8095* 0,8095*	0,8095* 0,8095*	0,8095* 0,8095*	0,7857* 0,7857*	1							
socs3	0,9048** 1,0000***	0,8095* 0,9524***		0,8095* 0,8095*	0,7143* 0,7619*	0,9286*** 0,9524***	0,9286*** 1,0000***	0,7857* 0,9048**				0,8810** 0,9286***																			
tbx21	0,8810** 0,9048**	0,8095* 0,8810**		0,8095* 0,7619*	0,8333* 0,7857*	0,7381* 0,9286***	0,7381* 0,9048**	0,7857* 0,8810**						0,7143* 0,7619*																	
tgfb1	0,9048** 0,9048**	0,8810** 0,9048**				1,0000*** 0,9286***	0,9524*** 0,9048**	0,8095* 0,7619*				0,8810** 0,8333*																			
ticam1	0,8810** 0,7619*					0,7857* 0,7857*	0,8095* 0,7619*	0,8810** 0,8333*																							
tr10				0,7381* 0,7143*					0,8810** 0,7619*																						
trf																															

Figura 38- Matriz de correlação de expressões gênicas, nos LT, compartilhadas com os dois grupos de experimentos: com menor e maior capacidade supressora de proliferação. As modificação de expressão gênica foram avaliadas após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nos LT apresentaram apenas correlações positivas entre suas modificações de expressão gênica. As correlações são compartilhadas entre os grupos de ensaios nos quais foi observada supressão de proliferação menor ou maior do que 50%. n=8 experimentos no total, dos quais 4 neste grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Correlação expressão gênica (AdMSC) compartilhada nos ensaios < supressão > supressão	ccl1	ccl17	ccl2	ccl22	cd274	faslg	foxp3	hgf	hif1a	hla_g	ido	ifng	il10	il12b	il13	il17	il4	lif	mmp9	nos2	nrp1	pou5f1	ptgs2	runx3	sema4d	tgfb	thy1	tnfa	vcam1	vegfa
ccl1	1																													
ccl17	0,8333* 0,8095*	1																												
ccl2	0,9524*** 0,9762***	0,8571** 0,8571**	1																											
ccl22	0,9762*** 0,9048**	0,8810** 0,7143*	0,9762*** 0,9524***	1																										
cd274	0,8095* 0,9762***	0,8571** 0,8571**	0,8333* 0,9762***	0,8333* 1,0000***	1																									
faslg	0,9762*** 0,9762***	0,8810** 0,8571**	0,9762*** 1,0000***	1,0000*** 0,9524***	0,8333* 0,9762***	1																								
foxp3				0,9048** 0,7619*			1																							
hgf								1																						
hif1a									1																					
hla_g	0,8333* 0,8095*		0,8095* 0,8333*	0,7619* 0,7143*	0,7857* 0,7857*	0,7619* 0,8333*				1																				
ido			0,9048** 0,7381*	0,8571** 0,8571**	0,7857* 0,7381*						1																			
ifng	0,9286*** 0,9524***	0,7381* 0,8333*	0,9524*** 0,9762***	0,9048** 0,9286***	0,8810** 0,9286***	0,9048** 0,9762***	0,7619* 0,7381*			0,9048** 0,8571**	0,9048** 0,7143*	1																		
il10	0,9524*** 0,8333*	0,8571** 0,8333*	1,0000*** 0,9762***	0,9762*** 0,9286***	0,8571** 0,9286***	0,8571** 0,9762***	0,8571** 0,7381*			0,8095* 0,8571**	0,9048** 0,7143*	0,9524*** 1,0000***	1																	
il12b														1																
il13		0,8333* 0,7619*					0,7381* 0,7381*								1															
il17																1														
il4																	1													
lif	0,7619* 0,7857*		0,7857* 0,8095*	0,7381* 0,7619*	0,9524*** 0,8810**	0,7381* 0,8095*					0,7381* 0,7381*	0,8810** 0,7857*	0,7857* 0,7857*																	
mmp9			0,7381* 0,7143*								0,8095* 0,8095*																			
nos2	0,8333* 0,9524***		0,8333* 0,9762***	0,8571* 0,9048**	0,7857* 1,0000***	0,8571** 0,9762***					0,9286*** 0,7143*	0,8333* 0,8333*	0,8333* 0,9286***																	
nrp1																														
pou5f1			0,7857* 0,7619*	0,7619* 0,8571**		0,7619* 0,7619*	0,8333* 0,8571**				0,7619* 0,7143*	0,8095* 0,7381*	0,7857* 0,7381*																	
ptgs2	0,8333* 0,9524***		0,9286*** 0,9762***	0,8571** 0,9048**	0,8810** 1,0000***	0,8571** 0,9762***				0,7619* 0,7857*	0,9048** 0,7143*	0,9524*** 0,9286***	0,9286*** 0,9286***																	
runx3	0,9286*** 0,8333*		0,9524*** 0,8571**	0,9762*** 0,8095*	0,7857* 0,8333*	0,9762*** 0,8571**					0,9048** 0,7857*	0,8571** 0,8333*	0,9524*** 0,8333*																	
sema4d	0,9048** 0,8810**		0,9048** 0,9286***	0,9286*** 0,9286***	0,9048** 0,8571**	0,9286*** 0,9286***	0,9286*** 0,7381*			0,7381* 0,7143*	0,7381* 0,8333*	0,8333* 0,9524***	0,9048** 0,9524***																	
tgfb																														
thy1																														
tnfa	0,9286*** 0,9286***	0,8571** 0,8333*	0,9524*** 0,9762***	0,9762*** 0,9286***	0,7857* 0,9524***	0,9762*** 0,9762***	0,8810** 0,7143*				0,9048** 0,7857*	0,8571** 0,9524***	0,9524*** 0,9524***																	
vcam1																														
vegfa																														

Figura 39 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nas AdMSC, compartilhadas com os dois grupos de experimentos: com menor e maior capacidade supressora de proliferação. As modificação de expressão gênica foram avaliadas após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nas AdMSC apresentaram apenas correlações positivas entre suas modificações de expressão gênica. As correlações são compartilhadas som os dois grupo de ensaios nos quais foi observada supressão de proliferação menor ou maior do que 50%. n=8 experimentos no total, dos quais 4 neste grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Menor supressão da proliferação	bcl2	ccr4	ccr8	ctla_4	ctnnb1	foxp3	gata3	hla_g	ido	il_10	il13	il_1b	il1r2	il4	il9	ifn	lgals1	lrrc32	mmp2	mmp9	nfatc2	rorc	runx3	s1pr1	socs3	tbx21	tgfb1	ticam1	tlr10	tnf	
bcl2	1																														
ccr4		1																													
ccr8			1																												
ctla_4				1																											
ctnnb1					1																										
foxp3						1																									
gata3							1																								
hla_g								1																							
ido									1																						
il_10										1																					
il13											1																				
il_1b												1																			
il1r2													1																		
il4														1																	
il9															1																
ifn																1															
lgals1													0,9048**				1														
lrrc32																		1													
mmp2																			1												
mmp9																				1											
nfatc2				0,7143*	0,7619*				0,8333*		0,7381*	0,7381*									1										
rorc									0,7143*		0,8333*							0,7857*				1									
runx3																			0,7619*				1								
s1pr1											0,7381*													1							
socs3												0,7857*														1					
tbx21																											1				
tgfb1				0,7381*	0,7857*				0,9048**															0,7381*				1			
ticam1		0,7143*							0,7143*																				1		
tlr10												0,8095*								0,8571**			0,7143*		0,7857*					1	
tnf																															1

Figura 40- Matriz de correlação de expressões gênicas, nos LT, exclusivas do grupo de experimentos com menor capacidade supressora de proliferação. As modificação de expressão gênica foram avaliadas após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nos LT apresentaram apenas correlações positivas entre suas modificações de expressão gênica. As correlações são exclusivas do grupo de ensaios nos quais foi observada supressão de proliferação menor do que 50%. n=8 experimentos no total, dos quais 4 neste grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Maioresupressão da proliferação	bcl2	ccr4	ccr8	ctla 4	ctnnb1	foxp3	gata3	hla_g	ido	il_10	il13	il_1b	il1r2	il4	il9	ifn	lgals1	lrrc32	mmp2	mmp9	nfatc2	rorc	runx3	s1pr1	socs3	tbx21	tgfb1	ticam1	ttr10	tnf
bcl2	1																													
ccr4		1																												
ccr8	0,7381*	0,7143*	1																											
ctla 4				1																										
ctnnb1					1																									
foxp3			0,7857*			1																								
gata3			0,7381*				1																							
hla_g		0,7857*			0,7381*			1																						
ido									1																					
il_10										1																				
il13					0,7143*			0,7381*				1																		
il_1b				0,7857*				0,7381*	0,7857*				1																	
il1r2										0,7143*				1																
il4	0,7143*		0,7381*			0,7381*	0,7143*	0,8095*	0,7381*					1																
il9															1															
ifn																1														
lgals1														0,7619*			1													
lrrc32														0,8333*				1												
mmp2	0,7857*																	0,7857*	1											
mmp9		0,7381*												0,9048**						1										
nfatc2			0,8810**																		1									
rorc																						1								
runx3		0,8333*									0,7143*												1							
s1pr1								0,7143*																1						
socs3			0,7381*											0,7143*											1					
tbx21											0,7857*							0,8095*	0,7381*		0,8333*				0,9048**	1				
tgfb1			0,9286***											0,7143*													1			
ticam1			0,7143*															0,7143*							0,7619*			1		
ttr10								0,7857*																					1	
tnf																														1

Figura 41- Matriz de correlação de expressões gênicas, nos LT, exclusivas do grupo de experimentos com maior capacidade supressora de proliferação. As modificação de expressão gênica foram avaliadas após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nos LT apresentaram apenas correlações positivas entre suas modificações de expressão gênica. As correlações são exclusivas do grupo de ensaios nos quais foi observada supressão de proliferação maior do que 50%. n=8 experimentos no total, dos quais 4 neste grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Menor supressão da proliferação da	cd1	cd17	cd2	cd22	cd274	faslg	foxp3	hgf	hif1a	hla_g	ido	ifng	il10	il12b	il13	il17	il4	lif	mmp9	nos2	nrp1	pou5f1	ptgs2	runx3	sema4d	tgfb	thy1	tnfa	vcam1	vegfa
cd1	1																													
cd17		1																												
cd2			1																											
cd22				1																										
cd274					1																									
faslg						1																								
foxp3	0,8333*	0,8095*	0,8571**		0,8810**	0,9048**	1																							
hgf								1																						
hif1a									1																					
hla_g								0,7857*		1																				
ido	0,8333*						0,7143*			0,7143*	1																			
ifng												1																		
il10													1																	
il12b														1																
il13															1															
il17																1														
il4																	1													
lif							0,7143*			0,7857*								1												
mmp9	0,7381*				0,7857*					0,7619*		0,8571**	0,7381*					0,8810**	1											
nos2							0,7857*												0,7143*	1										
nrp1								0,7143*	0,8333*												1									
pou5f1	0,7381*				0,9762***					0,7143*								0,9286***	0,8095*	0,7619*		1								
ptgs2							0,7381*												0,8095*			1								
runx3		0,8571**					0,8810**																1							
sema4d		0,7381*																						1						
tgfb																									1					
thy1																										1				
tnfa																											1			
vcam1					0,7857*																	0,7619*							1	
vegfa					0,7143*			0,7143*													0,7857*									1

Figura 42 - Matriz de correlação de expressões gênicas, nas AdMSC, exclusivas do grupo de experimentos com menor capacidade supressora de proliferação. As modificação de expressão gênica foram avaliadas após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas avaliados nas AdMSC apresentaram tanto correlações positivas quanto negativas entre suas modificações de expressão. As correlações são exclusivas do grupo de ensaios nos quais foi observada supressão de proliferação menor do que 50%. n=8 experimentos no total, dos quais 4 neste grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Maioresupressão da proliferação	cd1	ccl17	ccl2	cd22	cd274	faslg	foxp3	hgf	hif1a	hla_g	ido	ifng	il10	il12b	il13	il17	il4	lif	mmp9	nos2	nrp1	pou5f1	ptgs2	runx3	sema4d	tgfb	thy1	tnfa	vcam1	vegfa	
ccl1																															
ccl17		1																													
ccl2			1																												
cd22				1																											
cd274		0,9048*			1																										
faslg						1																									
foxp3							1																								
hgf								1																							
hif1a									1																						
hla_g		0,8810**					0,7143*			1																					
ido											1																				
ifng												1																			
il10													1																		
il12b														1																	
il13										0,8333*					1																
il17																1															
il4																	1														
lif		0,7619*																1													
mmp9				0,7381*		0,7143*													1												
nos2		0,9048**								0,7857*										1											
nrp1																					1										
pou5f1																						1									
ptgs2		0,9048**																					1								
runx3																				0,9286***				1							
sema4d																				0,8333*					1						
tgfb																										1					
thy1	-0,7619*		-0,7143*		-0,7619*	-0,7143*												-0,7143*	-0,7619*	-0,7619*				-0,7619*	-0,8571**	0,8333*	1				
tnfa										0,7857*								0,7857*	0,8095*									-0,7381*	1		
vcam1									-0,7619*		0,8095*													0,7619*				-0,7619*		1	
vegfa																														1	

Figura 43- de correlação de expressões gênicas, nas AdMSC, exclusivas do grupo de experimentos com maior capacidade supressora de proliferação. As modificação de expressão gênica foram avaliadas após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nas AdMSC apresentaram tanto correlações positivas quanto negativas entre suas modificações de expressão. As correlações são exclusivas do grupo de ensaios nos quais foi observada supressão de proliferação maior do que 50%. n=8 experimentos no total, dos quais 4 neste grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Os números indicam os valores da reta de correlação com o símbolo da significância de acordo com cada correlação *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Correlações exclusivas do grupo que apresentou inibição da proliferação < 50%		Correlações exclusivas do grupo que apresentou inibição da proliferação >50%	
Genes avaliados nos LT	Correlações positivas	Genes avaliados nos LT	Correlações positivas
BCL2	SC	BCL2	CCR8, IL4, MMP2
IL4	SC	IL4	LGALS1, LRRC31, MMP9, SOCS3, TGFB1, BCL2, CCR8, FOXP3, GATA, HLAG, IDO,
CCR8	SC	CCR8	BCL2, CCR4, FOXP3, GATA, IL4, NFATC2, SOCS3, TGFB, TICAM1
FOXP3	SC	FOXP3	CCR8, IL4
GATA3	SC	GATA3	CCR8, IL4
HLAG	SC	HLAG	CCR4, CTNNB1, IL13, IL1B, IL4, LRRC32, S1PR1, TLR10
IL10	SC	IL10	IL1R2
TBX21	SC	TBX21	IL13, SOCS3, MMP9, LRRC32, RORC
CCR4	TICAM1	CCR4	CCR8, HLAG, MMP9, RUX3
CTLA-4	NFATC2, TGFB	CTLA-4	IL1B
CTNNB1	NFATC2, TGFB	CTNNB1	HLAG, IL13
IDO	NFATC2, RORC, TGFB, TICAM1	IDO	IL1B, IL4
IL13	MMP9, RORC, S1RP1	IL13	CTNNB1, HLAG, RUNX3, TBX21
IL1B	MMP9, SOCS3, TLR10	IL1B	CTLA4, HLAG, IDO,
IL1R2	LGALS1	IL1R2	IL10
LGALS1	IL1R2	LGALS1	IL4
LRRC32	RORC	LRRC32	HLAG, IL4, MMP2, TBX21, TICAM1
MMP2	RUNX3, TLR10	MMP2	BCL2, LRRC32
MMP9	IL13, IL1B	MMP9	CCR4, IL4, TBX21
NFATC2	CTLA4, CTNNB1, IDO, S1RP1	NFATC2	CCR8
RORC	IDO, IL13, LRRC32	RORC	TBX21
RUNX3	MMP2, TLR10	RUNX3	IL13, CCR4
S1PR1	IL13, NFATC2, TGFB	S1PR1	HLAG
SOCS3	TLR10, IL1B	SOCS3	IL4, TBX21, TICAM1, CCR8
TGFB1	IDO, CTLA4, CTNNB1, RUNX3, S1RP1	TGFB1	CCR8, IL4
TICAM1	IDO, CCR4	TICAM1	LRRC32, SOCS3, CCR8
TLR10	IL1B, MMP2, RUNX3, SOCS3	TLR10	HLAG
TNF	SC	TNF	SC
IL9	SC	IL9	SC
INFg	SC	INFg	SC

Figura 44- Correlações entre modificações de expressão gênica nos LT exclusivas nos ensaios com menor (esquerda) ou maior (direita) supressão de proliferação. Modificação de expressão gênica avaliada após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nos LT apresentaram apenas correlações positivas entre suas modificações de expressão gênica. As correlações são exclusivas de cada grupo onde foi observada supressão de proliferação menor do que 50% ou maior do que 50%. Houve maior número de genes, cujas modificações foram correlacionadas no grupo de maior supressão de proliferação ($p=0,020$, Teste exato de Fisher. $n=8$ experimentos sendo 4 em cada grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Em verde os genes predominantemente imunorreguladores e em vermelho os predominantemente pró-inflamatórios, em preto genes com outras funções predominantes. SC = sem correlação.

Correlações exclusivas do grupo que apresentou inibição da proliferação < 50%			Correlações exclusivas do grupo que apresentou inibição da proliferação >50%		
Genes avaliados nas AdMSC	Correlações positivas	Correlações negativas	Genes avaliados nas AdMSC	Correlações positivas	Correlações negativas
CCL22	SC	SC	CCL22	MMP9	SC
IL13	SC	SC	IL13	HLAG	SC
TNFa	SC	SC	TNFa	HLAG, LIF, MMP9	THY1
CCL1	FOXP3, IDO, MMP9, POU5F1	SC	CCL1	SC	THY1
CCL17	FOXP3, RUNX3, SEMA4D	SC	CCL17	CD274, HLAG, LIF, NOS, PTGS2	
CCL2	FOXP3	SC	CCL2	SC	THY1
CD274	FOXP3, MMP9, POU5F1, VCAM1, VEGFA	SC	CD274	SC	THY1
VCAM1	CD274	SC	VCAM1	IDO, RUNX3	HIF1A, THY1
VEGFA	CD274	SC	VEGFA	SC	SC
FOXP3	CCL1, CCL17, CCL2, CD274, FASLG, IDO, LIF, NOS, POU5F1, PTGS2, RUNX3	SC	FOXP3	HLAG, POU5F1	SC
HLAG	IDO, LIF, MMP9, POU5F1	SC	HLAG	CCL17, FOXP3, IL13, NOS, TNFA	
IDO	CCL1, FOXP3, HLAG	SC	IDO	VCAM1	THY1
IL10	MMP9	SC	IL10	SC	SC
TGFB	SC	IL4	TGFB	THY1	SC
IL4	SC	NRP1, TGFB, THY1	IL4	SC	SC
LIF	FOXP3, HLAG, NOS2, POU5F1	SC	LIF	CCL17, TNFA	THY1
NOS2	FOXP3, LIF, MMP9, NOS2, POU5F1	SC	NOS2	CCL17, HLAG	THY1
NRP1	VEGFA, HIF1A	IL4	NRP1	SC	SC
PTGS2	FOXP3, MMP9, POU5F1	SC	PTGS2	CCL17	THY1
FASLG	FOXP3	SC	FASLG	MMP9	THY1
SEMA4D	CCL17, POU5F1	SC	SEMA4D	MMP9	
RUNX3	CCL17, FOXP3	SC	RUNX3	MMP9, VCAM1	THY1
IFNG	MMP9	SC	IFNG	SC	SC
HIF1A	NRP1	SC	HIF1A	SC	VCAM1
MMP9	CCL1, CD274, HLAG, IFNG, IL10, NOS2, POU5F1, PTGS2	SC	MMP9	RUNX3, SEMA4D, TNFA	THY1
POU5F1	CCL1, CD274, FOXP3, HLAG, LIF, MMP9, NOS2, PTGS2, SEMA4D, VCAM1	SC	POU5F1	FOXP3	SC
THY1	SC	IL4	THY1	TGFB	CCL1, CCL2, CD274, FASLG, IDO, LIF, MMP9, NOS2, PTGS2, RUNX, TNFA, VCAM1
HGF	SC	SC	HGF	SC	SC
IL12B	SC	SC	IL12B	SC	SC
IL17A	SC	SC	IL17A	SC	SC

Figura 45- Correlações entre modificações de expressão gênica nas AdMSC exclusivas nos ensaios com menor (esquerda) ou maior (direita) supressão de proliferação. Modificação de expressão gênica avaliada após 3 dias de cocultivo e após purificação celular. As moléculas avaliadas nas AdMSC apresentaram tanto correlações positivas quanto negativas entre suas modificações de expressão gênica. As correlações são exclusivas de cada grupo onde foi observada supressão de proliferação menor do que 50% ou maior do que 50%. Houve maior número de genes, cujas modificações foram correlacionadas no grupo de menor supressão de proliferação ($p=0,020$, Teste exato de Fisher. $n=8$ experimentos sendo 4 em cada grupo. As correlações foram feitas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. Em verde os genes predominantemente imunorreguladores e em vermelho os predominantemente pró-inflamatórios, em preto genes com outras funções predominantes. SC = sem correlação.

Discussão

6. Discussão

Nos últimos anos, diversas vias de imunorregulação exercidas pelas células tronco mesenquimais têm sido pontualmente discutidas. No entanto, ainda não está muito clara a relação entre quais moléculas podem estar, simultaneamente, envolvidas com a intensidade de imunossupressão exercida pelas MSC. Nós abordamos essa questão, usando uma estratégia na qual avaliamos, simultaneamente a produção protéica e um painel de expressão gênica, tanto nas AdMSC quanto nos LT, em ensaios onde as AdMSC exerceram uma imunossupressão mais, ou menos intensa.

A diversidade de mecanismos que envolvem a atividade supressora das MSC vem sendo abordada na literatura atual, valorizando-se pouco a heterogeneidade funcional imunossupressora, dessas células. Assim, tem-se apontado que variações experimentais tais como a origem da célula, concentrações celulares (Puissant *et al.*, 2005), diferentes estímulos, o contato célula-célula (Di Nicola *et al.*, 2002; Augello *et al.*, 2005) e diferentes condições usadas para compor o nicho das células *in vitro* (Ren *et al.*, 2008; Crop *et al.*, 2010) podem ser os principais fatores responsáveis pelos diferentes mecanismos imunossupressores descritos, até o momento, na literatura.

Com base em nossos dados, nós concluímos que a intensidade da atividade supressora das AdMSC está relacionada com a capacidade de ativar, simultaneamente, diversos genes relacionados à resposta imune. Ademais,

observamos modificações dominantes da expressão gênica, assim como fortes correlações positivas entre essas diversas moléculas, tanto nas AdMSC quanto nos LT, sugerindo que algumas modulações devem ser determinantes na capacidade supressora das AdMSC. No entanto, considerando que essas moléculas foram acionadas em todos os experimentos, elas não discriminam a maior ou menor atividade supressora. Por outro lado, há um perfil distinto e exclusivo de correlações entre diferentes modulações de expressão gênica, tanto nos LT quanto nas AdMSC, nos ensaios onde observamos uma maior imunossupressão (mais de 50% de inibição da proliferação de LT), em relação aos ensaios com menor inibição da proliferação de linfócitos T, capaz de discriminar os possíveis mecanismos de uma célula mais ou menos supressora.

Para os LT, observamos um perfil de correlações exclusivas entre as modificações de expressão gênica nos ensaios com maior supressão entre genes predominantemente imunorreguladores como entre HLAG e CCR4, IL13, IL4, TLR10, IL1B, LRRC32 (GARP), S1PR1 e CTNNB1 (β -catenina). Observamos também correlações positivas exclusivas de modulação da expressão gênica, nas AdMSC, entre quimiocinas, moléculas envolvidas no rolamento celular e de moléculas de imunorregulação, como entre CCL22 e MMP9 e entre HLAG e FOXP3. Além desses diversos potenciais mecanismos interconectados, apontamos moléculas não previamente descritas no contexto da imunorregulação das AdMSC, como SEMA4D, MMP9, CCL22 e RUNX3, cujas expressões relativas estavam aumentadas após o cocultivo, sugerindo seu possível envolvimento durante a atividade supressora das AdMSC. Isto

sugere que a intensidade de supressão depende da capacidade das AdMSC de ativar simultaneamente múltiplos caminhos correlacionados.

Durante a imunossupressão, as AdMSC também induziram a diminuição do número de células T efetoras ativadas CD4⁺ e CD8⁺, positivas para ICOS e de células T CD8⁺ positivas para OX40, além de induzir um aumento do número de uma população específica de Treg CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ que expressa CD73⁺, uma enzima importante para gerar adenosina a partir da degradação de AMP e, conseqüentemente, com atividade supressora. Assim, interpretamos que as AdMSC ativam uma complexa rede de moléculas relacionadas com quimioatração celular, migração, adesão e regulação da resposta imune, que culmina com a imunossupressão das células T. Essa ativação de múltiplos mecanismos poderia explicar a heterogeneidade funcional das AdMSC, bem como as discrepâncias de mecanismos que têm sido descritos na literatura (Klyushnenkova *et al.*, 2005; Nasef, Chapel *et al.*, 2007) sobre as moléculas mais frequentemente relatadas (IDO, TGF- β , IL-10, PTG₂) como envolvidas na capacidade supressora das MSC.

As AdMSC usadas neste trabalho foram imunofenotipicamente caracterizadas de acordo com o padrão sugerido na literatura (Parekkadan e Milwid, 2010). Dessa forma, esta é uma população livre de outras subpopulações celulares, como células hematopoiéticas, endoteliais e leucócitos, além de se autorrenovarem em cultura e terem a capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos quando estimuladas. No entanto, encontramos uma heterogeneidade quanto à porcentagem de positividade de CD44 e CD49e. Esse fenótipo poderia estar relacionado com sua capacidade

supressora, uma vez que são moléculas de adesão que auxiliam no contato entre MSC e as células do sistema imune. No entanto, não verificamos qualquer tipo de relação entre a positividade para CD49e e CD44 e a maior ou menor atividade imunorreguladora das AdMSC, sugerindo que essas variações não afetam essa atividade funcional das AdMSC.

Analisando a expressão de mRNA de FOXP3 nas AdMSC sem o cocultivo, percebemos que elas já expressavam um pequena quantidade desse fator de transcrição (os valores de Ct, do inglês, *cycle threshold* variavam de 32 a 35). No entanto, não conseguimos medir essa expressão, uma vez que o Real time nos permite apenas verificar a expressão relativa de mRNA da condição de cocultivo em relação à condição pura. Dessa forma, realizaremos futuramente a quantificação dessa molécula por citometria de fluxo para confirmarmos esses dados e verificarmos se intensidade de expressão em cada célula pode estar relacionada com sua maior ou menor atividade supressora. Interessantemente, observamos que o FOXP3 também teve sua expressão gênica aumentada nas AdMSC em todos os experimentos e pode emergir como um relevante fator de transcrição para a atividade immunossupressora das AdMSC, como já estabelecido para as Treg (Fontenot *et al.*, 2003) e mais recentemente, tendo sua expressão descrita nas próprias MSC (Sundin *et al.*, 2011).

As AdMSC apresentaram intensidade de inibição da proliferação de células T de uma forma dose dependente, como já descrito na literatura (Krampera *et al.*, 2006). Em apenas 3 ensaios, conseguimos verificar a capacidade inibidora das AdMSC em uma maior proporção de AdMSC

(AdMSC:PBMC 1:5), pois estas células não se descolaram da placa como nos outros 8 ensaios. É provável que as 3 AdMSC que se mantiveram aderidas por mais tempo, em cultura, tenham uma taxa de replicação mais lenta, favorecendo o seu contato com as PBMC por mais tempo, provavelmente liberando proteínas funcionais importantes para sua atividade imunossupressora. Por outro lado, uma vez que durante a replicação celular há a necessidade de se ativar a maquinaria protéica específica de replicação cromossômicas, é provável que nesse período da mitose, as AdMSC que se replicam mais rapidamente, deixem de produzir proteínas imunorreguladoras, e mesmo de interagir com outras células do sistema imune, prejudicando a sua ação supressora. Assim, essa possível heterogeneidade observada a partir da diferença na taxa de replicação, encontrada entre as AdMSC de doadores diferentes pode ser um dos fatores que influencie na sua atividade supressora diferencial. Pensamos nessa hipótese, pois, das 3 AdMSC que aumentaram a sua intensidade de inibição quando plaqueadas em uma maior proporção, 2 delas foram as mais supressoras também quando na proporção AdMSC:PBMC 1:10. Pudemos observar essa heterogeneidade celular de outra forma, uma vez que algumas AdMSC apresentaram expressão diferencial, de vários genes que podem afetar sua atividade funcional, tais como CCL17, IDO e FOXP3. Outros grupos têm observado a heterogeneidade das MSC por microarray (Katz et al., 2005) mostrando uma variedade de fenótipos em relação à expressão de integrinas e metaloproteinases nas MSC. No entanto, até o momento essa heterogeneidade não foi relacionada com as distintas redes

imunorreguladoras, e ainda não se sabe ao certo o que determina essa heterogeneidade.

As AdMSC inibiram tanto células CD3+ quanto células não CD3, o que pode ser ressaltado pela maior % de inibição de células totais que foram marcadas com CFSE (de 52% a 93% de inibição), quando comparado à porcentagem de células CD3+ (de 36% a 87% de inibição). Podemos sugerir que, como já descrito na literatura, outras populações celulares, além das células CD3+, como células NK (Krampera *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006), células B (Corcione *et al.*, 2006) estejam sofrendo uma supressão de proliferação mediada pelas AdMSC. Assim, as AdMSC que possuem uma maior capacidade supressora sobre os linfócitos T, também o fazem sobre a proliferação dessa outra população não CD3+. Sugerindo assim, que os mecanismos de supressão acionados pelas AdMSC mais potentes não atuem restritamente sobre LT, mas também sobre outras células do sistema imune, permitindo uma imunossupressão mais ampla, e conseqüentemente, mais eficaz.

Como citado anteriormente, observamos uma heterogeneidade da intensidade da capacidade supressora das AdMSC derivadas de diferentes indivíduos, com índices de inibição da proliferação variando de 36% até 87%. Observamos que metade das células teve capacidade supressora mais intensa (inibição > que 50%) e a outra metade menos intensa (< 50%). E foi justamente devido a essa heterogeneidade funcional que o delineamento experimental de nosso estudo nos permitiu observar, pela primeira vez, a diversidade de efeitos que essas diferentes AdMSC são capazes de exercer sobre as PBMC

provenientes de um mesmo indivíduo. Para tanto, analisamos o efeito das AdMSC na expressão de mRNA de um painel de moléculas relacionados com a resposta imune, assim como de produção de proteínas, tanto nas próprias AdMSC como nos LT, comparando os ensaios com maior ou menor inibição da proliferação de LT.

Assim, destacamos a primeira novidade observada em nosso trabalho: múltiplos caminhos são acionados simultaneamente, e vários estão inter-relacionados, havendo um padrão diferencial discriminando a maior ou menor potência inibitória das diferentes AdMSC, assim como um padrão dominante de moléculas correlacionadas, discriminando as vias de ação comuns entre todos os ensaios. Devido à complexidade dos dados gerados por essa abordagem utilizada, será necessário realizar futuramente uma investigação mais detalhada, incluindo ensaios funcionais para verificação experimental das diversas correlações encontradas entre a modulação da expressão gênica.

Dentre as diversas modificações de expressão gênica observadas, destacamos que algumas delas foram dominantes após a interação AdMSC/PBMC, ocorrendo em todos os experimentos realizados. Como por exemplo, o aumento da expressão gênica de IDO tanto nos LT quanto nas AdMSC, assim como o aumento da expressão gênica de IL1B e MMP2 (do inglês, *metalloproteinase 2*) nos LT. Apesar de as AdMSC serem provenientes de indivíduos diferentes, observamos muito mais modificações dominantes da expressão gênica do que nos LT (que eram de um mesmo indivíduo). Dos 30 genes estudados, 20 tiveram aumento dominante na sua expressão, dentre

eles PDL1, VCAM1, HLAG, IL10, SEMA4D, RUNX3 e MMP9 e os genes de quimiocinas, CCL1, CCL17, CCL2. Essa diferente dominância entre os dois subtipos celulares sugere que os mecanismos imunorreguladores acionados nos LT são mais heterogêneos. Apesar disso, fazendo um balanço das modificações observadas em ambas as células houve um predomínio de modificações do tipo REGULA (razão REGULA/INFLAMA = 5,50 para os LT e 2,72) para as AdMSC). Ou seja, tanto aumento da expressão de genes predominantemente imunorreguladores, quanto diminuição da expressão de genes próinflamatórios, reforçando a potente ação imunorreguladora das AdMSC que mantém um balanço final da maquinaria gênica e proteica favorável à uma resposta supressora.

Outra novidade de nosso trabalho foi que algumas dessas moléculas predominantemente aumentadas estão sendo moduladas simultaneamente, além de estarem positivamente inter-correlacionadas com o aumento da expressão gênica de outras moléculas. Algumas dessas moléculas já haviam sido descritas no contexto da imunossupressão das MSC, como IDO (Krampera *et al.*, 2006; Delarosa *et al.*, 2009), HLA-G (Nasef, Mathieu *et al.*, 2007), PDL-1 (Augello *et al.*, 2005; English *et al.*, 2007), IL-10 (Klyushnenkova *et al.*, 2005; Nasef, Chapel *et al.*, 2007) e VCAM-1 (Ren *et al.*, 2010). No entanto, não há relatos de que elas eram tão dominantes e principalmente, mobilizadas simultaneamente durante a atividade supressora das AdMSC. Assim, esses dados nos sugerem que, apesar de diversos mecanismos moleculares serem acionados, vários deles são dominantes e podem ser essenciais para a atividade supressora das AdMSC.

Nos LT, tanto o aumento da expressão gênica de IDO quanto de IL1B estavam correlacionados com o de MMP2, molécula apenas agora descrita no contexto da imunorregulação mediada pelas AdMSC. O aumento de IDO correlacionou-se positivamente com diversas outras modificações na expressão gênica de moléculas como FOXP3, CTNNB1 (Beta Catenina) e LRRC32 (GARP), sendo as 2 últimas moléculas, também descritas agora pela primeira vez no contexto da imunossupressão das AdMSC. Apesar de não termos abordado funcionalmente a importância direta dessas novas moléculas (MMP2, CTNNB1 e GARP), expressas nos LT, para a imunossupressão exercida pelas AdMSC, podemos levantar algumas questões.

As metaloproteinases têm sido relacionadas principalmente à atividade pró-inflamatória e não a uma função imunorreguladora, como poderíamos esperar, visto o aumento dominante nos nossos cocultivos. Já foi mostrado que uma deficiência ou inibição de MMP2 leva a uma inibição da rejeição de transplantes em modelos animais, bem como a uma diminuição do infiltrado de células mononucleares (Benson *et al.*, 2010). Além disso, os perfis celulares que produzem uma maior quantidade dessa enzima são Th0 e Th1 (Oviedo-Orta *et al.*, 2008), o que poderia sugerir que células com esse perfil estariam presentes em maior número em nossa cocultura. No entanto, não podemos chegar a essa conclusão uma vez que diversos outros fatores como a produção de citocinas e a análise de receptores característicos de cada população celular devem ser avaliados em conjunto para entendermos o perfil funcional que envolve os nossos cocultivos e que potencialmente contribui para imunorregulação. Não obstante, a MMP2 pode ter ação imunorreguladora

indireta, uma vez que é uma enzima importante para a transmigração celular e, portanto, pode estar aumentada naquelas células que foram induzidas a migrar para a proximidade das AdMSC, contribuindo para que elas exercessem uma imunossupressão mais eficiente.

Para apoiar essa nossa interpretação, trazemos um novo dado no contexto das AdMSC humanas. Observamos um aumento da expressão gênica de mRNA das quimiocinas CCL22 e CCL17 nas AdMSC bem como de CXCL10 e CCL5 em nível protéico, enfatizando a importância em promover a migração e recrutamento de células para a proximidade das AdMSC. Esta migração pode favorecer o recrutamento de células T reguladoras, como descrito com as quimiocinas CCL22 e CCL17, no contexto da infecção pelo vírus da Hepatite C (Riezu-Boj *et al.*), e com a quimiocina CCL1 (Batten *et al.*, 2006) no contexto das MSC de medula óssea, ou mesmo favorecendo a aproximação entre as células supressoras e as efetoras, como mostrado para CXCL9 e CXCL10 com as MSC murinas (Ren *et al.*, 2008).

Uma outra molécula com expressão gênica aumentada nos LT, no contexto da imunorregulação, foi LRRC32 (ou GARP), que é um receptor de membrana rico em domínios de leucina presente na superfície de células T reguladoras ativadas, que se liga ao TGF- β latente composto por 2 subunidades, uma do LAP (do inglês *latency-associated peptide*) e outra do TGF- β (Stockis *et al.*, 2009), contribuindo para a atividade supressora das subpopulações de Treg, além de induzir a expressão de FOXP3 em células T *naive* (Wang *et al.*, 2009). Com esse achado podemos pensar que a subpopulação de células Treg expressando LAP pode também estar envolvida

na imunorregulação exercida pelas AdMSC. Vale destacar que avaliamos a expressão de LAP na superfície das AdMSC e observamos uma diminuição da sua expressão após o cocultivo com os LT. Uma vez que o complexo do TGF- β latente é clivado e liberado da sua âncora, GARP, na membrana celular após ativação, é possível que a diminuição de LAP nas AdMSC deva-se à liberação do complexo TGF- β latente que poderá contribuir para sua atividade imunossupressora, a partir da forma ativa solúvel do TGF- β . No entanto, ainda precisamos medir a proteína no sobrenadante da cultura para, experimentalmente testar, essa interpretação.

Outro efeito observado das AdMSC sobre os LT foi o aumento do número de um subtipo de célula T reguladora que expressa CD73, uma ectoenzima que, por meio da hidrólise do AMP libera adenosina, que através da interação com receptores purinérgicos do tipo P1, inibe a resposta próinflamatória (Kobie *et al.*, 2006). Essa molécula foi encontrada na superfície de células T reguladoras e descrita como envolvida na supressão de células TCD4 efectoras pela conversão de 5'adenosina monofosfato em adenosina. Recentemente, foi descrito na literatura o aumento de uma população CD4+CD25+CD73+ no contexto da imunorregulação exercida pelas AdMSC (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011). Nós acrescentamos uma nova informação mostrando que as células que expressam CD73 são também FOXP3+. É possível que essas moléculas, em conjunto, incrementem a capacidade supressora das células T reguladoras. Ademais, a indução de células T reguladoras como importantes mediadoras da supressão no contexto das AdMSC tem sido descrita (Batten *et al.*, 2006; Di Ianni *et al.*, 2008; Selmani *et al.*, 2008) porém, sem referência a subpopulações

distintas de Treg. Visto que as AdMSC acionam diversos mecanismos de ação, é plausível que induzam outros subtipos específicos de células Treguladoras, além das CD4+CD25+FOXP3+CD73+.

Com o objetivo de verificar se diferentes subpopulações de Treg eram induzidas pelas AdMSC, analisamos, no 3º dia de cocultivo, Treg CD4+CD25^{hi}FOXP3+, que expressam distintos receptores de quimiocinas como CXCR3+, CCR4+CCR5+ e CCR7+, importantes para migração para sítios específicos, conforme a predominância de seus ligantes (Campbell e Koch, 2011). No entanto, observamos modificações apenas das populações de Treg CXCR3+ e CCR4+CCR5+ que apresentaram o número de células menor após o contato com as AdMSC, sugerindo que essas populações não estejam sendo induzidas ou mesmo que não tenham proliferado, provavelmente não contribuindo para uma imunossupressão, mas que se trate de populações que estejam sendo inibidas pelas próprias AdMSC, ou mesmo que estejam morrendo por possíveis mecanismos de indução de apoptose que podem ser desencadeados pelas AdMSC (Plumas *et al.*, 2005). Neste contexto, apesar de muitas quimiocinas estarem sendo produzidas pelas AdMSC, é provável que quimiocinas, como CXCL10 e CCL5, aumentadas em ambientes próinflamatórios, levem essas células T com receptores específicos (CXCR3 e CCR5) para a proximidade das AdMSC favorecendo sua ação supressora e, posteriormente, a inibição da proliferação desses próprios linfócitos T. Além disso, a manutenção do número de células CCR7+ pode indicar um controle exercido pelas AdMSC de uma proliferação exacerbada de células CD4+, uma vez que, na presença da quimiocina ligante de CCR7, CCL21 foi descrito um

aumento de proliferação homeostática de células T CD4⁺ (Ploix *et al.*, 2001). Considerando que células Th2 recentemente ativadas têm a expressão de seus receptores CCR4 e CCR8 aumentada (D'ambrosio *et al.*, 1998), é possível que, inicialmente, haja uma completa inibição da ativação celular pelas AdMSC, idéia esta também reforçada pela diminuição do número células ativadas com o fenótipo CD4⁺ICOS⁺, CD8⁺ICOS⁺ e CD8⁺OX40⁺. A molécula OX40 (CD134) está envolvida no desencadeamento da função efetora das células T e sua coestimulação aumenta a proliferação celular (Gramaglia *et al.*, 1998). De forma semelhante, a molécula ICOS foi descrita como um novo membro da família CD28, mas que diferentemente da molécula CD28 que é expressa constitutivamente, a expressão de ICOS é induzida *de novo* na superfície das células T, indicando que aquelas com altos níveis de expressão estariam na fase final de ativação (Hutloff *et al.*, 1999). Dessa forma, a observação desse novo efeito das AdMSC, diminuindo o número de células efetoras pode indicar a atividade das AdMSC em uma fase tardia da ativação celular, contribuindo para a manutenção de um milieu menos inflamatório.

O favorecimento de um milieu mais imunorregulador também pode ser observado pelo dominante aumento da expressão de mRNA da citocina IL-10 nas AdMSC, bem como no sobrenadante dos cocultivos, este apenas com 1 dia de interação entre AdMSC e PBMC. Assim, a IL-10 parece ter um papel importante mais precoce no mecanismo de imunossupressão exercido pelas AdMSC, podendo não só atuar diretamente nos LT, suprimindo a sua proliferação e produção de citocinas inflamatórias, como indiretamente pela indução de outra molécula imunorreguladora, HLA-G (Selmani *et al.*, 2008),

visto que também observamos aumento de sua expressão gênica no 3 dia após o cocultivo. Além disso, observamos desde o primeiro dia de cocultivo, uma diminuição, mas não inibição completa, da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e, a partir do terceiro dia, de IFN- γ , sugerindo o efeito anti-inflamatório das AdMSC, contribuindo para um ambiente de interação mais imunorregulador. Como mencionado anteriormente, observamos nos cocultivos, uma diminuição da produção de IFN- γ , na presença das AdMSC no terceiro dia. Apesar dessa diminuição, o nível de produção desta citocina se manteve maior quando comparado à mesma condição, no primeiro dia de cocultivo. Este dado e o fato de termos encontrado um aumento de expressão gênica de mRNA de IL1B e IFNG nas células após o cocultivo, enfatizam a importância da presença de citocinas pró-inflamatórias, mesmo que em baixas concentrações, compondo o microambiente inflamatório, favorecendo a capacidade imunossupressora das AdMSC, como já descrito (Crop *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2010). A presença dessas citocinas pode, assim, ter induzido um aumento de outras moléculas em nossos cocultivos, importantes para a imunorregulação, como por exemplo, IDO, PDL-1, CXCL10 e NOS. Já foi descrito que IFN- γ induz IDO (Krampera *et al.*, 2006; Delarosa *et al.*, 2009) e PDL-1 (English *et al.*, 2007) no contexto da imunossupressão das MSC em humanos e camundongos, respectivamente. Além disso, a presença de IFN- γ juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 α , e IL-1 β , induz um padrão distinto de moléculas como as quimiocinas CXCL10 e CXCL9 e iNOS, também importantes para imunossupressão (Ren *et al.*, 2008). Portanto, parece ocorrer

constantemente um equilíbrio fino entre citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras, que contribui para o efeito de imunossupressão.

Vale ainda ressaltar a importância desse tipo de estudo, avaliando não só moléculas imunorreguladoras, mas também pró-inflamatórias, e relacionadas a outras funções celulares, de forma que possamos entender um pouco mais a interconexão entre elas e como poderiam contribuir para o desfecho da imunorregulação. O perfil de correlação entre as modificações de produção de citocinas produzidas nos sobrenadantes dos cocultivos é um dado interessante que destaca a importância das interações entre as células e o ambiente no qual elas se encontram, contribuindo para desfechos imunossupressores distintos. Nos ensaios onde as AdMSC foram mais supressoras, encontramos no primeiro dia de interação um aumento da produção proteica de IL-10 e uma correlação positiva entre a diminuição precoce da produção de TNF- α e IFN- γ . Já nos ensaios onde as AdMSC foram menos supressoras, essa correlação aconteceu apenas mais tardiamente, no terceiro e quinto dias de interação. Isso nos sugere que a inibição precoce das citocinas pró-inflamatórias, juntamente com a indução de IL-10 pode contribuir para um mecanismo que favoreça uma inibição mais potente exercida pelas AdMSC, devido a outras interações moleculares que podem ser desencadeadas.

Para as AdMSC, além dos mecanismos imunorreguladores mencionados anteriormente, podemos destacar algumas correlações entre as modificações dominantes da expressão gênica. Por exemplo, o aumento da modificação de expressão de SEMA4D foi correlacionado positivamente com todas as moléculas cujos aumentos de expressão gênica foi dominante, ou

seja, encontrados em todos os experimentos. Além disso, a expressão de mRNA de IL10 e PDL1 foi inter-correlacionada, positivamente, além de estarem correlacionadas com o aumento da expressão gênica de HLA-G e IDO. Esses dados acrescentam uma novidade à atividade imunorreguladora das AdMSC pois indicam que todas essas múltiplas vias imunorreguladoras estão correlacionadas e atuando conjuntamente.

Algumas das moléculas aqui mencionadas como induzidas nas AdMSC, confirmam dados recentemente publicados na literatura, como para PDL1 (Augello *et al.*, 2005; English *et al.*, 2007), VCAM1 (Ren *et al.*, 2010) e FOXP3 (Sundin *et al.*, 2011). No entanto, até o momento nenhuma dessas moléculas havia sido descrita no contexto das células tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo. Juntamente com essas informações, o aumento da expressão gênica dominante de MMP9, RUNX3 e SEMA4D adicionam novos potenciais mecanismos imunorreguladores ainda não descritos nesse contexto. O fator de transcrição RUNX3 foi descrito nas MSC no contexto da diferenciação condrogênica (Delorme *et al.*, 2009), mas nas células T atua em conjunto com Tbet na diferenciação do subtipo celular Th1 (Naito *et al.*), podendo exercer um papel semelhante nas MSC, mas que precisa ainda ser elucidado. MMP9 é uma metaloproteinase induzida por IL1 β , e descrita nas MSC de medula óssea, mas não de tecido adiposo, como uma importante molécula para o direcionamento e migração dessas células para os tecidos inflamados (Ries *et al.*, 2007). Além disso, a migração das AdMSC para os sítios de inflamação depende também de outras moléculas como CD44 e VCAM-1, também induzidas por uma citocina próinflamatória, o TNF- α (Bocker *et al.*, 2008).

Dessa forma, o aumento da MMP9 nas AdMSC pode contribuir indiretamente para atividade imunossupressora das AdMSC, de forma a atraí-las para o local onde exercerão imunorregulação. Outra molécula ainda não descrita nas AdMSC, nem mesmo no contexto da imunorregulação é a SEMA4D (do inglês, *semaphorin-4D*). A SEMA4D foi a primeira semaforina encontrada em células do sistema imune, assim como nos órgãos linfóides e não linfóides, como cérebro e rim, (Ishida et al., 2003), mas ainda não descrita em células mesenquimais. Até o momento, sua função no sistema imune tem sido relacionada com a indução de uma resposta inflamatória (Ishida et al., 2003). Apenas a SEMA-3A (do inglês, *Semaphorin-3A*) foi recentemente descrita, juntamente com a Galectina-1, como importantes moléculas imunossupressoras das MSC pois, ao se ligar ao receptor da Neuropilina-1 (NP-1) nos linfócitos T, inibiram sua proliferação (Lepelletier *et al.*, 2009). Assim, uma vez que SEMA4D em conjunto com MMP9 tiveram sua expressão gênica aumentada nas AdMSC após cocultivo com PBMC, precisamos melhor investigar a importância dessas moléculas no contexto da imunorregulação, para futuramente poder indicá-las como potenciais novos caminhos de imunorregulação das AdMSC.

Após o cocultivo, observamos nas AdMSC e nos LT, não apenas aumento de expressão de moléculas relacionadas à imunorregulação (FOXP3, SEMA4D, GARP, IDO, HLAG, PTGS2, CTNNA1, PD1L) como também à adesão (VCAM1), rolamento (MMP2, MMP9), resposta inflamatória (IL1B, IFNG), quimioatração (CCL1, CCL2, CCL20, CXCL10, CCL5) e sobrevivência celular (BCL2), como diminuição da expressão de moléculas relacionadas à

ativação celular (ICOS e OX40). Isso indica que a interação AdMSC/LT ativa uma complexa rede de interações moleculares que culminam na aproximação celular, aumentando sua interação e atividade supressora das AdMSC, além da indução de células T reguladoras com um fenótipo específico (TegCD73+) e da inibição da ativação de células T CD4 e CD8, por meio da diminuição da população de células OX40 e ICOS positivas. Não obstante, o padrão de correlações entre todas essas moléculas não foi igual entre as AdMSC que tiveram maior ou menor capacidade supressora. De forma interessante, as AdMSC mais supressoras possuem, assim como induzem nos LT, um painel de correlações de modificações de expressão gênica exclusivas. Essa é a primeira vez em que diversas moléculas são correlacionadas com a intensidade de supressão exercida pelas AdMSC, nos sugerindo que a magnitude da capacidade supressora das AdMSC depende da ativação sinérgica de diversas moléculas importantes para a resposta imune, após a interação AdMSC/PBMC.

Nos LT, apenas nos ensaios onde observamos maior supressão as moléculas GATA3, HLAG, IL10, IL4, BCL2, FOXP3, TBX21 e CCR8 apresentaram algum tipo de correlação exclusiva. Já nas AdMSC, o número de moléculas com modificações de expressão gênica exclusivamente correlacionadas, nas células com maior capacidade supressora, foi bem menor. Nos ensaios de alta capacidade supressora, as moléculas que apresentaram exclusivas correlações foram CCL22, IL13 e TNFA.

Ressaltamos que no grupo onde as AdMSC foram mais supressoras, houve, nos LT, correlações positivas entre aumento de expressão gênica de

CCR8 com BCL2, CCR4, FOXP3, GATA, IL4, SOCS3, e TGFB, além de Foxp3 com CCR8 e IL4, e de BCL2 com CCR8, IL4 e MMP2. Chama-nos a atenção, nessas múltiplas interações, o envolvimento da resposta Th2 juntamente com outras moléculas imunorreguladoras e de sobrevivência, possivelmente desempenhando um importante papel na magnitude da resposta supressora. Vale ressaltar que diversas moléculas aqui correlacionadas refletem a participação na mesma via de polarização funcional de linfócitos, para Th2, como CCR8 (Soler *et al.*, 2006), SOCS3 (Egwuagu *et al.*, 2002) e GATA3 (Zheng e Flavell, 1997).

É interessante ressaltar que outras moléculas imunorreguladoras como TGFB e FOXP3, tiveram muitas modificações de expressão gênica exclusivamente correlacionadas com CCR8 reiterando a importância simultânea da resposta Th2 e imunorreguladora na maior resposta inibidora das AdMSC. Apesar de CCR8 ser expresso em um subtipo de células T CD4 de memória, foi também descrito nas células T reguladoras e Th2 (Soler *et al.*, 2006), além de ser expresso em células T produtoras de IL-10, no modelo murino de granuloma (Freeman *et al.*, 2005), ou mesmo induzido por TGF- β (Takimoto *et al.*), apontando um importante papel desse receptor também na imunorregulação. No contexto das AdMSC, a importância da resposta Th2 já havia sido relatada (Batten *et al.*, 2006), no entanto, ainda não correlacionada com tantas outras moléculas imunorreguladoras, nem mesmo discriminando um provável papel na maior potência supressora das MSC.

Algumas outras correlações aqui encontradas, nos ensaios de maior supressão, já haviam sido descritas em outro contexto, como por exemplo a

citocina IL-4 aumentando a expressão Bcl-2 e protegendo células T e B de apoptose (Dancescu *et al.*, 1992), ou mesmo a fosforilação da própria Bcl-2 induzindo a atividade de MMP2 (Lu e Hong, 2009). Além disso, a correlação entre a expressão de HLA-G com CTNNB1 (Beta catenina) que foi observada como importante na manutenção da sobrevivência de células T reguladoras no sistema murino (Ding *et al.*, 2008), reforça a idéia de uma ação integrada de redes imunorreguladoras, de mobilização para migração celular, sobrevivência celular que culmina com a maior ação supressora das AdMSC.

As correlações específicas na modificação de expressão gênica nas AdMSC, dentre outras, envolve as 2 novas moléculas aqui descritas no contexto da imunossupressão, CCL22 e MMP9, que podem favorecer a quimioatração de células T reguladoras, bem como a migração das AdMSC para o local da inflamação e contribuir para uma maior potência supressora. Ademais, a correlação nos ensaios de maior supressão envolvendo HLAG, TNF e FOXP3, pode indicar um importante papel dessas moléculas na capacidade supressora das AdMSC, uma vez que o fator de transcrição FOXP3 foi recentemente descrito nas MSC (Sundin *et al.*, 2011) e a expressão de HLA-G pode ser aumentada por TNF (Rouas-Freiss *et al.*, 2007), ampliando sua ação reguladora.

A discussão sobre a existência de MSC funcionalmente distintas, bem como as diferentes vias que elas induzem, se torna importante uma vez que, pensando em uma terapia futura, células específicas podem ser selecionadas conforme a resposta que se deseja obter. Em algumas situações, talvez não seja tão apropriado usar células com grande potência supressora in vivo, uma

vez que essa potente atividade imunorreguladora e a ativação desse diversos mecanismos imunorreguladores podem favorecer o desenvolvimento de tumores, ou mesmo de infecções.

Portanto, podemos sugerir que, inicialmente, as AdMSC são capazes criar um nicho favorável para exercer sua atividade, aumentando a produção de moléculas atratoras bem como moléculas de adesão e migração celular. Dessa forma podem inibir a ativação de linfócitos T, recrutar subpopulações específicas de células reguladoras, como aquelas com o fenótipo CD73+ e induzir imunossupressão mediada pela interação celular via PD1L, vias de catabolismo de adenosinas e por citocinas imunorreguladoras como IL-10. É possível que posteriormente, outros tipos celulares sejam recrutados, contribuindo com o enriquecimento da atividade supressora, como outros tipos de subpopulações T reguladoras bem como Th2. Assim, as AdMSC utilizam múltiplos e diferentes mecanismos durante a imunossupressão, ativando uma complexa rede de moléculas que culmina com a inibição da proliferação de linfócitos T. Esses múltiplos mecanismos podem nos ajudar a entender melhor a complexidade de ação das AdMSC e a compreender os diferentes caminhos que elas podem acionar, influenciando no seu potencial supressor.

Conclusões

7. Conclusões

- i. A atividade supressora das células mesenquimais humanas de tecido adiposo (AdMSC) envolve a mobilização simultânea e correlacionada de múltiplas moléculas da resposta imune e relacionadas à migração e sobrevivência celular, tanto nos linfócitos T (LT) como nas AdMSC, indicando a importância da ação integrada de múltiplas vias moleculares.
- ii. A ocorrência de modificações de expressão gênica dominantes de algumas moléculas, durante a atividade supressora das AdMSC, (nos LT: o aumento da expressão de IDO, ILB e MMP2; nas AdMSC: IDO, HLAG, IL10, PDL1, SEMAD4, MMP9, FASL e várias quimiocinas) sugere que essas moléculas sejam importantes para a atividade supressora das AdMSC.
- iii. Identificamos diversas novas moléculas e mecanismos potencialmente envolvidos na atividade das AdMSC (nos LT: aumento da expressão de: MMP2, LRCC32, CTNNB1, aumento de células T reguladoras que expressam a ectoenzima, CD73, diminuição de células T efetoras ativadas expressando ICOS e OX40; nas AdMSC: aumento da expressão de RUNX3, SEMA4D e MMP9, e aumento de AdMSC

expressando PDL1, CXCL10 e CCL5). Considerando esses dados e os múltiplos outros mecanismos imunorreguladores já descritos para a atividade supressora das MSC, concluímos que a sua atividade supressora envolve uma complexa rede de interações celulares e moleculares relacionadas não apenas à resposta imune (imunorregulação, adesão, migração, rolamento celular), mas também relacionadas à sobrevivência celular, ciclo celular e o metabolismo extracelular das purinas.

- iv.** As AdMSC derivadas de diferentes indivíduos apresentam diferentes intensidades de atividade supressora. Identificamos, pela primeira vez, um perfil imunomolecular específico relacionado à sua maior capacidade supressora, com correlações positivas diferenciais entre os aumentos da expressão gênica (nos linfócitos T: correlações entre HLAG e CCR4, IL13, IL4, TLR10, IL1B, GARP, S1PR1 e LRRC32; nas AdMSC: correlações entre CCL22 com MMP9, e HLAG com FOXP3). Concluímos que a magnitude da atividade supressora das AdMSC depende da combinação de múltiplas vias moleculares mobilizadas de forma integrada, e relacionadas com a indução de um perfil Th2, migração e sobrevivência celular, bem como com a atividade imunorreguladora.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

Aggarwal, S. e M. F. Pittenger. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood, v.105, n.4, Feb 15, p.1815-22. 2005.

Aksu, A. E., E. Horibe, J. Sacks, R. Ikeguchi, J. Breitingner, M. Scozio, J. Unadkat e M. Feili-Hariri. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. Clin Immunol, v.127, n.3, Jun, p.348-58. 2008.

Augello, A., R. Tasso, S. M. Negrini, A. Amateis, F. Indiveri, R. Cancedda e G. Pennesi. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol, v.35, n.5, May, p.1482-90. 2005.

Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, A. Moseley e R. Hoffman. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol, v.30, n.1, Jan, p.42-8. 2002.

Batten, P., P. Sarathchandra, J. W. Antoniw, S. S. Tay, M. W. Lowdell, P. M. Taylor e M. H. Yacoub. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to

tissue engineering human heart valves. Tissue Eng, v.12, n.8, Aug, p.2263-73. 2006.

Beyer Nardi, N. e L. Da Silva Meirelles. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handb Exp Pharmacol, n.174, p.249-82. 2006.

Benson, H. L., S. Mobashery, M. Chang, F. Kheradmand, J. S. Hong, G. N. Smith, R. A. Shilling e D. S. Wilkes. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells. Am J Respir Cell Mol Biol, v.44, n.5, May, p.700-8. 2010.

Bocker, W., D. Docheva, W. C. Prall, V. Egea, E. Pappou, O. Rossmann, C. Popov, W. Mutschler, C. Ries e M. Schieker. IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. J Mol Med (Berl), v.86, n.10, Oct, p.1183-92. 2008.

Campagnoli, C., I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono e N. M. Fisk. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood, v.98, n.8, Oct 15, p.2396-402. 2001.

Campbell, D. J. e M. A. Koch. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat Rev Immunol, v.11, n.2, Feb, p.119-30. 2011.

Carosella, E. D., P. Moreau, J. Lemaoult e N. Rouas-Freiss. HLA-G: from biology to clinical benefits. Trends Immunol, v.29, n.3, Mar, p.125-32. 2008.

Chung, Y., J. H. Chang, M. N. Kweon, P. D. Rennert e C. Y. Kang. CD8alpha-11b+ dendritic cells but not CD8alpha+ dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. Blood, v.106, n.1, Jul 1, p.201-6. 2005.

Comoli, P., F. Ginevri, R. Maccario, M. A. Avanzini, M. Marconi, A. Groff, A. Cometa, M. Cioni, L. Porretti, W. Barberi, F. Frassoni e F. Locatelli. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. Nephrol Dial Transplant, v.23, n.4, Apr, p.1196-202. 2008.

Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G. L. Mancardi, V. Pistoia e A. Uccelli. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood, v.107, n.1, Jan 1, p.367-72. 2006.

Covas, D. T., R. A. Panepucci, A. M. Fontes, W. A. Silva, Jr., M. D. Orellana, M. C. Freitas, L. Neder, A. R. Santos, L. C. Peres, M. C. Jamur e M. A. Zago. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. Exp Hematol, v.36, n.5, May, p.642-54. 2008.

Crop, M. J., C. C. Baan, S. S. Korevaar, J. N. Ijzermans, M. Pescatori, A. P. Stubbs, W. F. Van Ijcken, M. H. Dahlke, E. Eggenhofer, W. Weimar e M. J. Hoogduijn. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol, v.162, n.3, Dec, p.474-86. 2010.

D'ambrosio, D., A. Iellem, R. Bonecchi, D. Mazzeo, S. Sozzani, A. Mantovani e F. Sinigaglia. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. J Immunol, v.161, n.10, Nov 15, p.5111-5. 1998.

Da Silva Meirelles, L., A. I. Caplan e N. B. Nardi. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells, v.26, n.9, Sep, p.2287-99. 2008.

Dancescu, M., M. Rubio-Trujillo, G. Biron, D. Bron, G. Delespesse e M. Sarfati. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. J Exp Med, v.176, n.5, Nov 1, p.1319-26. 1992.

Danke, N. A., D. M. Koelle, C. Yee, S. Beheray e W. W. Kwok. Autoreactive T cells in healthy individuals. J Immunol, v.172, n.10, May 15, p.5967-72. 2004.

Dazzi, F. e F. M. Marelli-Berg. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: close encounters with T cells. Eur J Immunol, v.38, n.6, Jun, p.1479-82. 2008.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom e S. C. Robson. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med, v.204, n.6, Jun 11, p.1257-65. 2007.

Delarosa, O., E. Lombardo, A. Beraza, P. Mancheno-Corvo, C. Ramirez, R. Menta, L. Rico, E. Camarillo, L. Garcia, J. L. Abad, C. Trigueros, M. Delgado e D. Buscher. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. Tissue Eng Part A, v.15, n.10, Oct, p.2795-806. 2009.

Delorme, B., J. Ringe, C. Pontikoglou, J. Gaillard, A. Langonne, L. Sensebe, D. Noel, C. Jorgensen, T. Haupl e P. Charbord. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. Stem Cells, v.27, n.5, May, p.1142-51. 2009.

Di Ianni, M., B. Del Papa, M. De Ioanni, L. Moretti, E. Bonifacio, D. Cecchini, P. Sportoletti, F. Falzetti e A. Tabilio. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. Exp Hematol, v.36, n.3, Mar, p.309-18. 2008.

Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti e A. M. Gianni. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood, v.99, n.10, May 15, p.3838-43. 2002.

Ding, Y., S. Shen, A. C. Lino, M. A. Curotto De Lafaille e J. J. Lafaille. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. Nat Med, v.14, n.2, Feb, p.162-9. 2008.

Djouad, F., B. Delorme, M. Maurice, C. Bony, F. Apparailly, P. Louis-Pence, F. Canovas, P. Charbord, D. Noel e C. Jorgensen. Microenvironmental changes

during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. Arthritis Res Ther, v.9, n.2, p.R33. 2007.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop e E. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v.8, n.4, p.315-7. 2006.

English, K., F. P. Barry, C. P. Field-Corbett e B. P. Mahon. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. Immunol Lett, v.110, n.2, Jun 15, p.91-100. 2007.

Egwuagu, C. E., C. R. Yu, M. Zhang, R. M. Mahdi, S. J. Kim e I. Gery. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. J Immunol, v.168, n.7, Apr 1, p.3181-7. 2002.

Erices, A., P. Conget e J. J. Minguell. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol, v.109, n.1, Apr, p.235-42. 2000.

Freeman, C. M., B. C. Chiu, V. R. Stolberg, J. Hu, K. Zeibecoglou, N. W. Lukacs, S. A. Lira, S. L. Kunkel e S. W. Chensue. CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4+CD25+ T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice. J Immunol, v.174, n.4, Feb 15, p.1962-70. 2005.

Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, I. e K. V. Petrakova. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol, v.16, n.3, Dec, p.381-90. 1966.

Glennie, S., I. Soeiro, P. J. Dyson, E. W. Lam e F. Dazzi. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood, v.105, n.7, Apr 1, p.2821-7. 2005.

Gonzalez-Rey, E., M. A. Gonzalez, N. Varela, F. O'valle, P. Hernandez-Cortes, L. Rico, D. Buscher e M. Delgado. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, v.69, n.1, Jan, p.241-8. 2010.

Gramaglia, I., A. D. Weinberg, M. Lemon e M. Croft. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. J Immunol, v.161, n.12, Dec 15, p.6510-7. 1998.

Grigoropoulos, N. F. e A. Mathur. Stem cells in cardiac repair. Curr Opin Pharmacol, v.6, n.2, Apr, p.169-75. 2006.

Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray e R. P. Phipps. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol, v.23, n.3, Mar, p.144-50. 2002.

Haynesworth, S. E., M. A. Baber e A. I. Caplan. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. J Cell Physiol, v.166, n.3, Mar, p.585-92. 1996.

Hinterberger, M., M. Aichinger, O. P. Da Costa, D. Voehringer, R. Hoffmann e L. Klein. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. Nat Immunol, v.11, n.6, Jun, p.512-9. 2010.

Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause e A. Keating. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v.7, n.5, p.393-5. 2005.

Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos e R. A. Kroczeck. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. Nature, v.397, n.6716, Jan 21, p.263-6. 1999.

Hunt, J. S., M. G. Petroff, R. H. McIntire e C. Ober. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. FASEB J, v.19, n.7, May, p.681-93. 2005.

Igura, K., X. Zhang, K. Takahashi, A. Mitsuru, S. Yamaguchi e T. A. Takashi. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy, v.6, n.6, p.543-53. 2004.

Ishida, I., A. Kumanogoh, K. Suzuki, S. Akahani, K. Noda e H. Kikutani. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses. Int Immunol, v.15, n.8, Aug, p.1027-34. 2003.

Karussis, D., C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinsky, B. Gowda-Kurkalli, J. M. Gomori, I. Kassis, J. W. Bulte, P. Petrou, T. Ben-Hur, O. Abramsky e S. Slavin. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol, v.67, n.10, Oct, p.1187-94. 2010.

Klyushnenkova, E., J. D. Mosca, V. Zernetkina, M. K. Majumdar, K. J. Beggs, D. W. Simonetti, R. J. Deans e K. R. McIntosh. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. J Biomed Sci, v.12, n.1, p.47-57. 2005.

Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell e T. R. Mosmann. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. J Immunol, v.177, n.10, Nov 15, p.6780-6. 2006.

Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarasci, B. Mazzinghi, G. Pizzolo, F. Vinante, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani e F. Annunziato. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells, v.24, n.2, Feb, p.386-98. 2006.

Kronsteiner, B., S. Wolbank, A. Peterbauer, C. Hackl, H. Redl, M. V. Griensven e C. Gabriel. Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Amnion Influence T-Cells Depending on Stimulation Method and Presence of Other Immune Cells. Stem Cells Dev, Apr 19. 2011.

Kyewski, B. e L. Klein. A central role for central tolerance. Annu Rev Immunol, v.24, p.571-606. 2006.

Le Blanc, K., C. Gotherstrom, O. Ringden, M. Hassan, R. McMahon, E. Horwitz, G. Anneren, O. Axelsson, J. Nunn, U. Ewald, S. Norden-Lindeberg, M. Jansson, A. Dalton, E. Astrom e M. Westgren. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. Transplantation, v.79, n.11, Jun 15, p.1607-14. 2005.

Le Blanc, K. e O. Ringden. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. J Intern Med, v.262, n.5, Nov, p.509-25. 2007.

Le Blanc, K., C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg e O. Ringden. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol, v.31, n.10, Oct, p.890-6. 2003.

Le Blanc, K., L. Tammik, B. Sundberg, S. E. Haynesworth e O. Ringden. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol, v.57, n.1, Jan, p.11-20. 2003.

Lemoli, R. M., F. Bertolini, R. Cancedda, M. De Luca, A. Del Santo, G. Ferrari, S. Ferrari, G. Martino, F. Mavilio e S. Tura. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? Haematologica, v.90, n.3, Mar, p.360-81. 2005.

Lepelletier, Y., S. Lecourt, A. Renand, B. Arnulf, V. Vanneaux, J. P. Femand, P. Menasche, T. Domet, J. P. Marolleau, O. Hermine e J. Larghero. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. Stem Cells Dev, v.19, n.7, Jul, p.1075-9. 2009.

Lu, Q. e W. Hong. Bcl2 enhances c-Myc-mediated MMP-2 expression of vascular smooth muscle cells. Cell Signal, v.21, n.7, Jul, p.1054-9. 2009

Locke, M., J. Windsor e P. R. Dunbar. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. ANZ J Surg, v.79, n.4, Apr, p.235-44. 2009.

Manrique, S. Z., M. A. Correa, D. B. Hoelzinger, A. L. Dominguez, N. Mirza, H. H. Lin, J. Stein-Streilein, S. Gordon e J. Lustgarten. Foxp3-positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor growth. J Exp Med, v.208, n.7, Jul 4, p.1485-99. 2011.

Mazzini, L., I. Ferrero, V. Luparello, D. Rustichelli, M. Gunetti, K. Mareschi, L. Testa, A. Stecco, R. Tarletti, M. Miglioretti, E. Fava, N. Nasuelli, C. Cisari, M. Massara, R. Vercelli, G. D. Oggioni, A. Carriero, R. Cantello, F. Monaco e F. Fagioli. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. Exp Neurol, v.223, n.1, May, p.229-37. 2009.

Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by

indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4619-21.

Miller, J. F. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol*, v.11, n.7, Jul, p.489-95. 2011.

Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman e A. M. Hill. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, v.164, n.12, Jun 15, p.6166-73. 2000.

Mitchell, J. B., K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu e J. M. Gimble. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, v.24, n.2, Feb, p.376-85. 2006.

Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*, v.11, n.1, Jan, p.21-7. 2010.

Nasef, A., A. Chapel, C. Mazurier, S. Bouchet, M. Lopez, N. Mathieu, L. Sensebe, Y. Zhang, N. C. Gorin, D. Thierry e L. Fouillard. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr*, v.13, n.4-5, p.217-26. 2007.

Nasef, A., N. Mathieu, A. Chapel, J. Frick, S. Francois, C. Mazurier, A. Boutarfa, S. Bouchet, N. C. Gorin, D. Thierry e L. Fouillard. Immunosuppressive effects of

mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. Transplantation, v.84, n.2, Jul 27, p.231-7. 2007.

Naito, T., H. Tanaka, Y. Naoe e I. Taniuchi. Transcriptional control of T-cell development. Int Immunol, Sep 23.

Oviedo-Orta, E., A. Bermudez-Fajardo, S. Karanam, U. Benbow e A. C. Newby. Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. Immunology, v.124, n.1, May, p.42-50. 2008.

Parekkadan, B. e J. M. Milwid. Mesenchymal stem cells as therapeutics. Annu Rev Biomed Eng, v.12, Aug 15, p.87-117. 2010.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig e D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v.284, n.5411, Apr 2, p.143-7. 1999.

Ploix, C., D. Lo e M. J. Carson. A ligand for the chemokine receptor CCR7 can influence the homeostatic proliferation of CD4 T cells and progression of autoimmunity. J Immunol, v.167, n.12, Dec 15, p.6724-30. 2001.

Plumas, J., L. Chaperot, M. J. Richard, J. P. Molens, J. C. Bensa e M. C. Favrot. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. Leukemia, v.19, n.9, Sep, p.1597-604. 2005.

Puissant, B., C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla e A. Blancher. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol, v.129, n.1, Apr, p.118-29. 2005.

Ramasamy, R., H. Fazekasova, E. W. Lam, I. Soeiro, G. Lombardi e F. Dazzi. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. Transplantation, v.83, n.1, Jan 15, p.71-6. 2007.

Rasmusson, I., O. Ringden, B. Sundberg e K. Le Blanc. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. Exp Cell Res, v.305, n.1, Apr 15, p.33-41. 2005.

Ren, G., L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A. I. Roberts, R. C. Zhao e Y. Shi. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell, v.2, n.2, Feb 7, p.141-50. 2008.

Ren, G., X. Zhao, L. Zhang, J. Zhang, A. L'huillier, W. Ling, A. I. Roberts, A. D. Le, S. Shi, C. Shao e Y. Shi. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. J Immunol, v.184, n.5, Mar 1, p.2321-8. 2010.

Ries, C., V. Egea, M. Karow, H. Kolb, M. Jochum e P. Neth. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. Blood, v.109, n.9, May 1, p.4055-63. 2007.

Riezu-Boj, J. I., E. Larrea, R. Aldabe, L. Guembe, N. Casares, E. Galeano, I. Echeverria, P. Sarobe, I. Herrero, B. Sangro, J. Prieto e J. J. Lasarte. Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. J Hepatol, v.54, n.3, Mar, p.422-31.

Rouas-Freiss, N., P. Moreau, C. Menier, J. Lemaoult e E. D. Carosella. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. Semin Cancer Biol, v.17, n.6, Dec, p.413-21. 2007.

Saldanha-Araujo, F., F. I. Ferreira, P. V. Palma, A. G. Araujo, R. H. Queiroz, D. T. Covas, M. A. Zago e R. A. Panepucci. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. Stem Cell Res, v.7, n.1, Jul, p.66-74. 2011.

Sato, K., K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Muroi e K. Ozawa. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood, v.109, n.1, Jan 1, p.228-34. 2007.

Selmani, Z., A. Naji, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella e F. Deschaseaux. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce

CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. Stem Cells, v.26, n.1, Jan, p.212-22. 2008.

Shi, Y., G. Hu, J. Su, W. Li, Q. Chen, P. Shou, C. Xu, X. Chen, Y. Huang, Z. Zhu, X. Huang, X. Han, N. Xie e G. Ren. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. Cell Res, v.20, n.5, May, p.510-8. 2010.

Singer, N. G. e A. I. Caplan. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. Annu Rev Pathol, v.6, Feb 28, p.457-78. 2011.

Soler, D., T. R. Chapman, L. R. Poisson, L. Wang, J. Cote-Sierra, M. Ryan, A. McDonald, S. Badola, E. Fedyk, A. J. Coyle, M. R. Hodge e R. Kolbeck. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3⁺ regulatory and Th2 effector lymphocytes. J Immunol, v.177, n.10, Nov 15, p.6940-51. 2006.

Spaggiari, G. M., A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari e L. Moretta. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. Blood, v.107, n.4, Feb 15, p.1484-90. 2006.

Stockis, J., D. Colau, P. G. Coulie e S. Lucas. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. Eur J Immunol, v.39, n.12, Dec, p.3315-22. 2009.

Stoltz, J. F., D. Bensoussan, V. Decot, A. Ciree, P. Netter e P. Gillet. Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview. Biomed Mater Eng, v.16, n.4 Suppl, p.S3-S18. 2006.

Sundin, M., P. D'arcy, C. C. Johansson, A. J. Barrett, H. Lonnie, B. Sundberg, S. Nava, R. Kiessling, D. Mougiakakos e K. Le Blanc. Multipotent mesenchymal stromal cells express FoxP3: a marker for the immunosuppressive capacity? J Immunother, v.34, n.4, May, p.336-42. 2011.

Spaggiari, G. M., A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari e L. Moretta. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood, v.111, n.3, Feb 1, p.1327-33. 2008.

Spaggiari, G. M., A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari e L. Moretta. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. Blood, v.107, n.4, Feb 15, p.1484-90. 2006.

Takimoto, T., Y. Wakabayashi, T. Sekiya, N. Inoue, R. Morita, K. Ichiyama, R. Takahashi, M. Asakawa, G. Muto, T. Mori, E. Hasegawa, S. Saika, T. Hara, M. Nomura e A. Yoshimura. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. J Immunol, v.185, n.2, Jul 15, p.842-55.

Tang, Q. e J. A. Bluestone. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nat Immunol, v.9, n.3, Mar, p.239-44. 2008.

Tian, Y., Y. B. Deng, Y. J. Huang e Y. Wang. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. Immunol Invest, v.37, n.1, p.29-42. 2008.

Traggiai, E., S. Volpi, F. Schena, M. Gattorno, F. Ferlito, L. Moretta e A. Martini. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. Stem Cells, v.26, n.2, Feb, p.562-9. 2008.

Von Bahr, L., B. Sundberg, L. Lonnie, B. Sander, H. Karbach, H. Hagglund, P. Ljungman, B. Gustafsson, H. Karlsson, K. Le Blanc e O. Ringden. Long-Term Complications, Immunologic Effects, and Role of Passage for Outcome in Mesenchymal Stromal Cell Therapy. Biol Blood Marrow Transplant, Aug 4. 2011.

Wang, R., L. Kozhaya, F. Mercer, A. Khaitan, H. Fujii e D. Unutmaz. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, n.32, Aug 11, p.13439-44. 2009.

Wing, K. e S. Sakaguchi. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. Nat Immunol, v.11, n.1, Jan, p.7-13. 2010.

Zannettino, A. C., S. Paton, A. Arthur, F. Khor, S. Itescu, J. M. Gimble e S. Gronthos. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a

perivascular phenotype in vitro and in vivo. J Cell Physiol, v.214, n.2, Feb, p.413-21. 2008.

Zappia, E., S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo, F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi e A. Uccelli. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood, v.106, n.5, Sep 1, p.1755-61. 2005.

Zheng, W. e R. A. Flavell. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell, v.89, n.4, May 16, p.587-96. 1997.

Anexos

ANEXO 1: Curvas de dissociação dos primers usados para as AdMSC

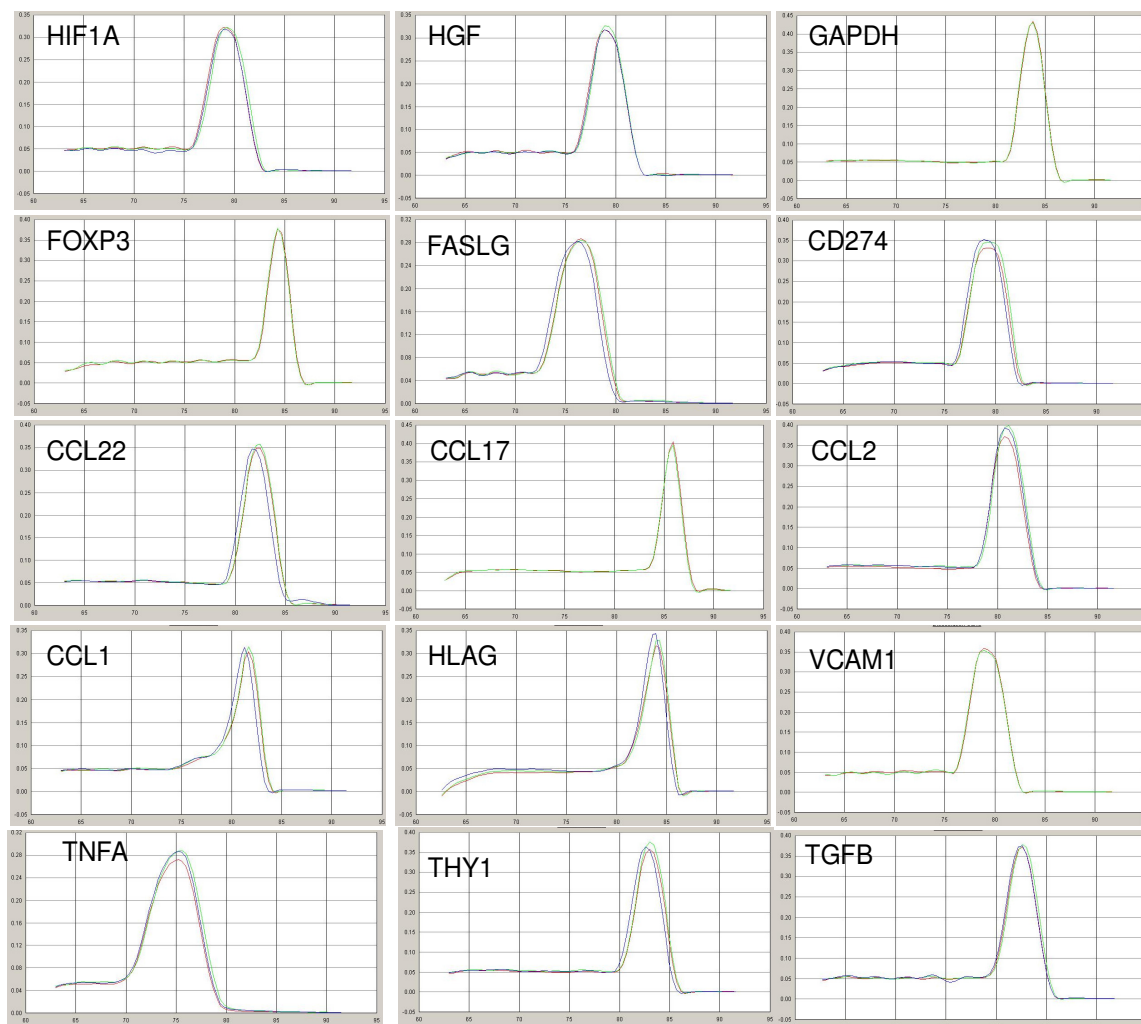
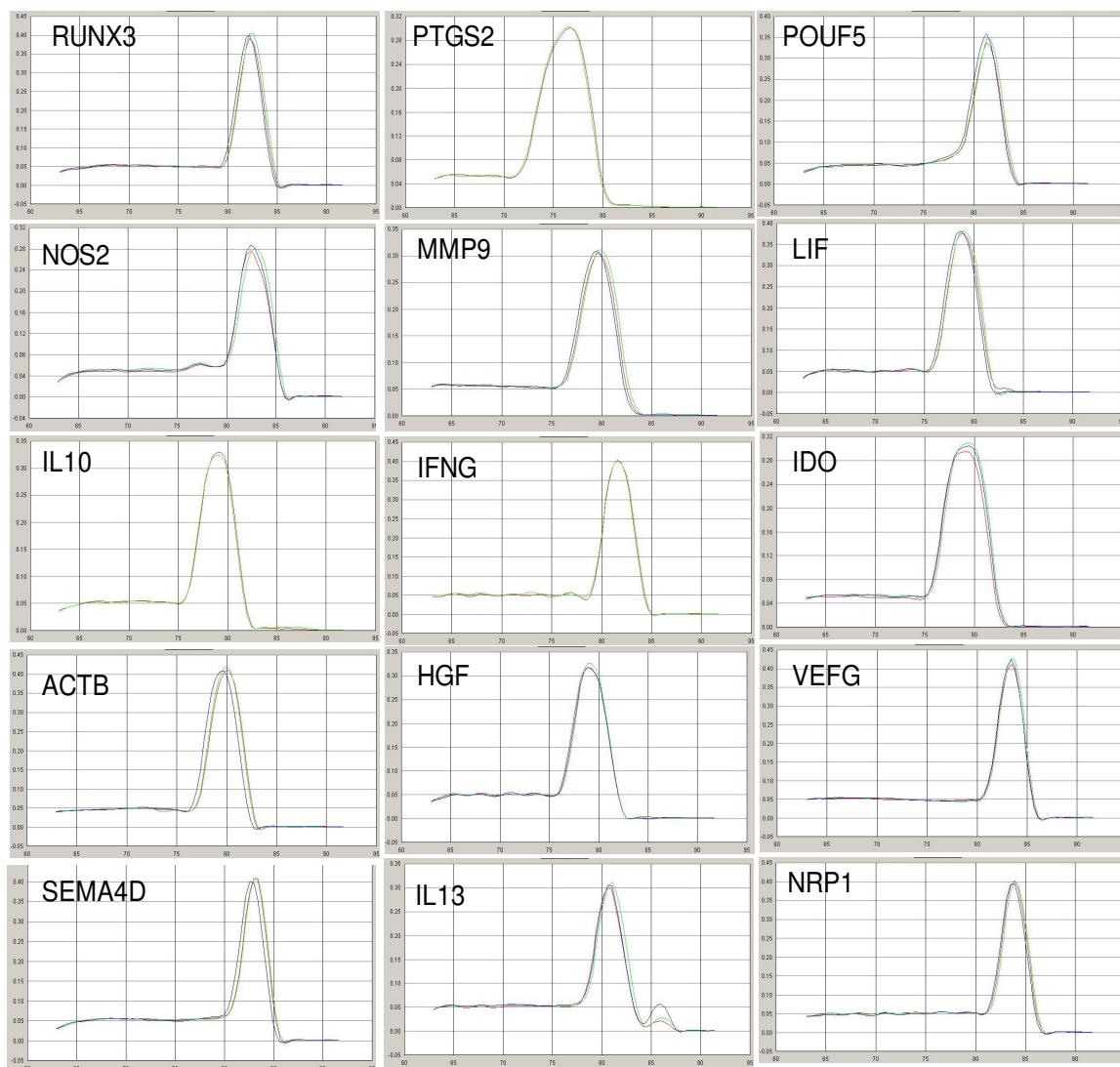


Figura 46- Curvas de dissociação dos genes avaliados nas AdMSC. Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos) (HIF1A, HGF, GAPDH, Fxp3, TGF β , FASLG, CD274, THY1, CCL22, CCL17, CCL2, TNFA, CCL1, HLAG, VCAM1).



Continuação da Figura 46- Curvas de dissociação dos genes avaliados nas AdMSC . Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos). (RUNX3, PTGS2, POUF5, NOS2, MMP9, LIF, IL10, IFNG, IDO, ACTB, HGF, VEGF, SEMA4D, IL13, NRP1).

ANEXO 2: Curvas de dissociação dos primers usados para os LT

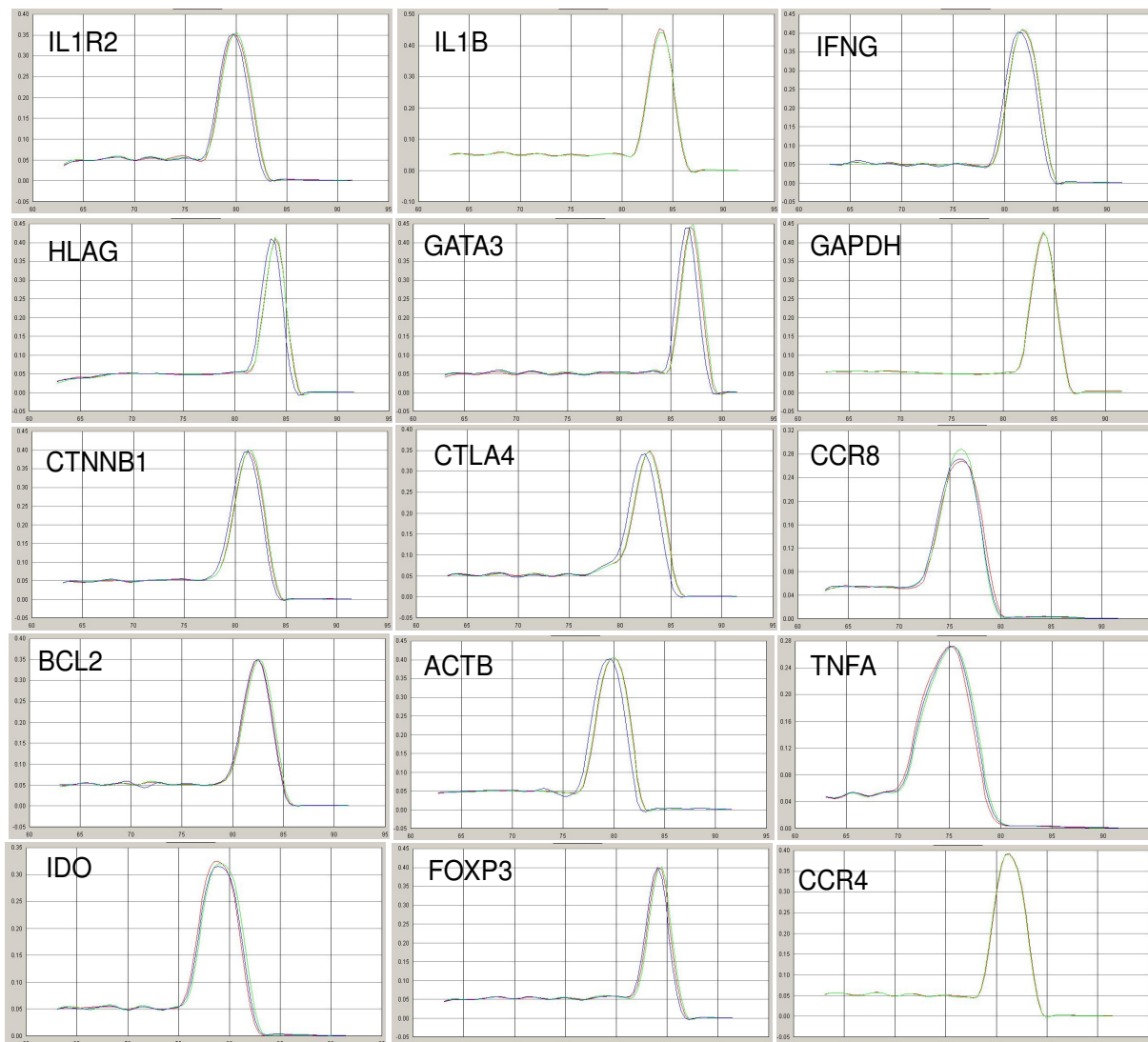
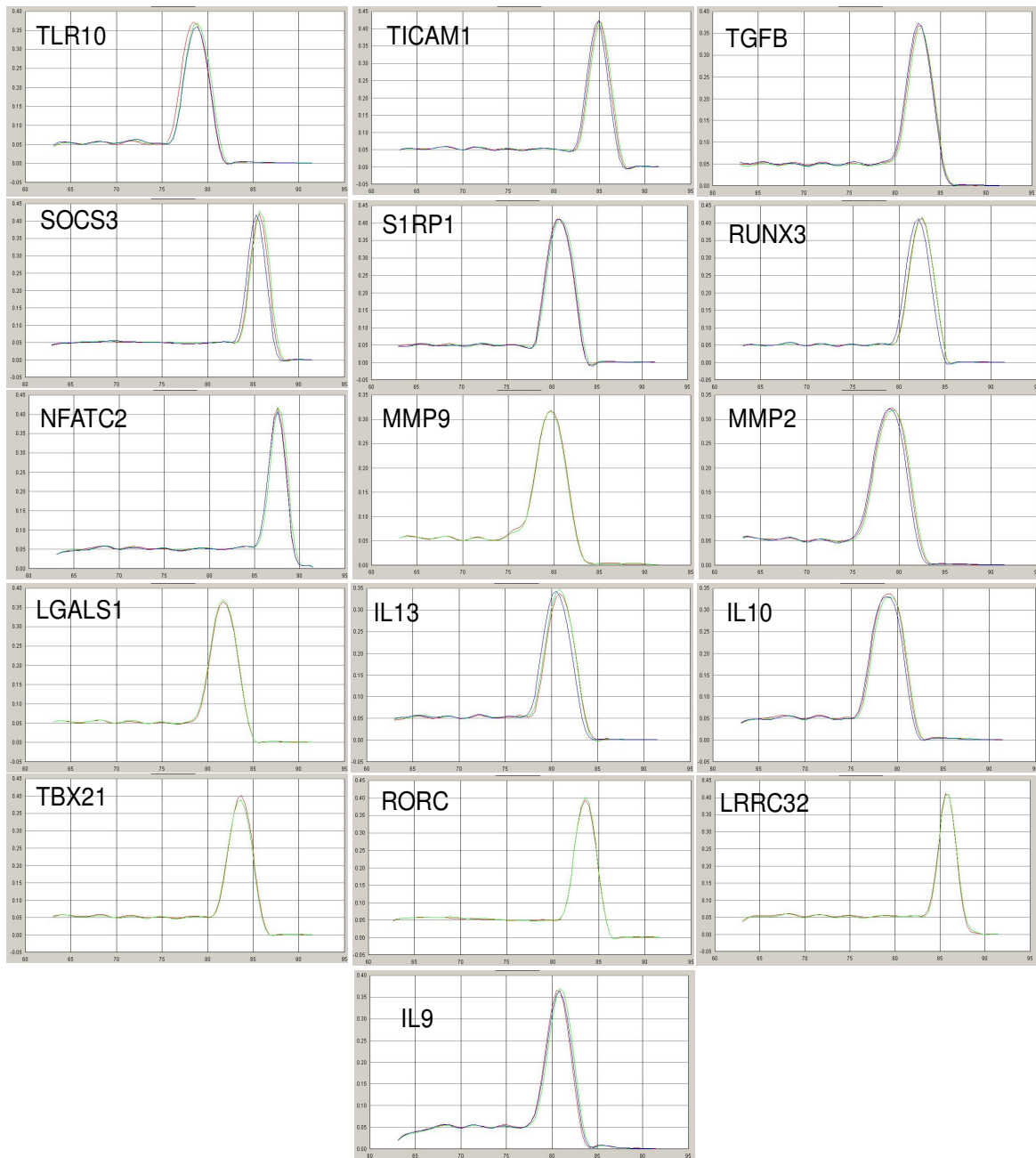


Figura 47- Curvas de dissociação dos genes avaliados nos LT. Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos). (ILR2, IL1B, IFNG, HLAG, GATA3, GAPDH, CTNNB1, CTLA4, CCR8, CCR4, BCL2, ACTB, TNFA, IDO, FOXP3).



Continuação da Figura 47 - Curvas de dissociação dos genes avaliados nos LT. Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos). (TLR10, TICAM1, TGFB, SOCS3, S1RP1, RUNX3, NFATC2, MMP9, MMP2, LGALS1, IL13, IL10, TBX21, RORC, LRRC32, IL9).

ANEXO 3: Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CAPPesq



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0765/09**, intitulado: "**CÉLULAS MESENQUIMAIS HUMANAS: BASES MOLECULARES DA ATIVIDADE IMUNORREGULADORA IN VITRO**," apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doadores Voluntários.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Verônica Coelho**

Pesquisador (a) Executante: **Carolina Lavini Ramos**

CAPPesq, 08 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail:

cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
19/10/2009
Dibora

ANEXO 4: Termo de Consentimento para doadores saudáveis de gordura

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD
(.....)**DADOS SOBRE A PESQUISA****1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** : “Células Mesenquimais Humanas: Bases Moleculares da Atividade Imunorreguladora *in vitro*”,**PESQUISADOR EXECUTANTE:** Carolina Lavini Ramos**CARGO/FUNÇÃO:** Aluna de mestrado pela disciplina Ciências Médicas – Processos Imunes e Infecciosos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.**PESQUISADOR** : Verônica Coelho**CARGO/FUNÇÃO:** Médica pesquisadora do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração – Professora Colaboradora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.**INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL** Nº 45907

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração dos Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Essas informações estão sendo fornecidas para esclarecer sobre a sua participação voluntária neste estudo. Investigaremos se as células tronco que estão na gordura (chamadas de células tronco mesenquimais) podem diminuir inflamação (chamamos de capacidade imunorreguladora). O estudo será feito com a gordura que seria descartada após a cirurgia de lipoaspiração. Usaremos a gordura para isolar as células de nosso interesse para esta pesquisa. Essas células serão separadas no laboratório de Imunologia do Instituto do Coração e serão usadas em experimentos nos quais verificaremos se elas conseguem diminuir ou inibir uma resposta de inflamação, nas condições do laboratório. Essas células não serão usadas em seres vivos.

A sua participação nesta pesquisa será apenas doar a gordura que seria descartada após a sua cirurgia. Desta forma, não há qualquer risco ou desconforto a mais para você, com a sua participação neste estudo. Esclarecemos que o nosso envolvimento será unicamente com a pesquisa que realizaremos. Assim, a responsabilidade da cirurgia e outras intervenções necessárias para a lipoaspiração ou dela decorrentes serão assumidas por seu médico. Esclarecemos, também, que em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos e/ou informação sobre o andamento da pesquisa. Destacamos que a sua doação da gordura e os resultados desta pesquisa não trarão benefícios diretos para você. Os conhecimentos gerados com essas pesquisas poderão ajudar-nos a compreender melhor como essas células funcionam e abrem possibilidades para futuros estudos nos quais este tipo de célula poderá ser testado para o tratamento de algumas doenças imunológicas, como diabetes e também nos transplantes.

A principal investigadora é a Dra Verônica Coelho, médica pesquisadora do Instituto do Coração – Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que pode ser encontrada no endereço: Laboratório de Imunologia – InCor - Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44, bloco II 9andar. São Paulo, SP. Telefone(s) 11-3069-5905.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnnet.usp.br

É garantida a você a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada nenhuma identificação. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Essas células serão utilizadas em experimentos exclusivamente feitos em laboratório. No entanto, elas poderão ser armazenadas e utilizadas futuramente em outros experimentos também feitos no laboratório, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Células Mesenquimais Humanas: Bases Moleculares da Atividade Imunorreguladora *in vitro*".

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o meu médico sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a informações sobre a pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO 5: Termo de Consentimento para doadores saudáveis de células mononucleares de sangue periférico

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** "Células Mesenquimais Humanas: Bases Moleculares da Atividade Imunorreguladora *in vitro*",

PESQUISADOR EXECUTANTE: Carolina Lavini Ramos

CARGO/FUNÇÃO: Aluna de mestrado pela disciplina Ciências Médicas – Processos Imunes e Infecciosos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

PESQUISADOR : Verônica Coelho

CARGO/FUNÇÃO: Médica pesquisadora do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração – Professora Colaboradora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45907

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração dos Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Essas informações estão sendo fornecidas para esclarecer sobre a sua participação voluntária neste estudo. Investigaremos se as células tronco que estão na gordura (chamadas de células tronco mesenquimais podem diminuir inflamação (chamamos de capacidade imunorreguladora). O estudo será feito com a gordura que seria descartada após a cirurgia de lipoaspiração. Usaremos a gordura para isolar as células de nosso interesse para esta pesquisa. Essas células serão separadas no laboratório de Imunologia do Instituto do Coração e serão usadas em experimentos nos quais verificaremos se elas conseguem diminuir ou inibir uma resposta de inflamação, nas condições do laboratório. Esta resposta de inibição da proliferação será avaliada com outro tipo de célula chamado linfócito T presentes nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) . Essas células não serão usadas em seres vivos.

A sua participação nesta pesquisa será doar 100 ml de sangue periférico (doador voluntário), ou as PBMC que seriam descartadas após a sua doação de sangue no Hemocentro do Hospital das Clínicas de São Paulo. Desta forma, não há qualquer risco ou desconforto a mais para você, com a sua participação neste estudo. Caso seja doador das células que seriam descartadas após a doação do sangue, a responsabilidade da coleta e outras intervenções necessárias serão assumidas pelo Hemocentro. Se for doador voluntário de sangue, o desconforto durante a coleta de sangue da veia do seu braço será somente o de uma picada da agulha. Esclarecemos, também, que em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos e/ou informação sobre o andamento da pesquisa. Destacamos que a sua doação da gordura e os resultados desta pesquisa não trarão benefícios diretos para você. Os conhecimentos gerados com essas pesquisas poderão ajudar-nos a compreender melhor como as células mesenquimais funcionam e abrem possibilidades para futuros estudos nos quais este tipo de célula poderá ser testado para o tratamento de algumas doenças imunológicas, como diabetes e também nos transplantes.

A principal investigadora é a Dra Verônica Coelho, médica pesquisadora do Instituto do Coração – Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que pode ser encontrada no endereço: Laboratório de Imunologia – InCor - Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44, bloco II 9andar. São Paulo, SP. Telefone(s) 11-3069-5905.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br

É garantida a você a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento;

