



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2014

**INÊS SOFIA
CANTANTE NOBRE**

**AÇÃO REGULADORA DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DO ESTROMA NAS CÉLULAS NK
EM ARTRITE REUMATÓIDE**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**INÊS SOFIA
CANTANTE NOBRE**

**AÇÃO REGULADORA DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DO ESTROMA NAS CÉLULAS NK
EM ARTRITE REUMATÓIDE**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Técnico Superior de Saúde Assessor no Instituto Português do Sangue e Transplantação de Coimbra e co-orientação do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Principal do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

professora associada com agregação do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva

investigador do Instituto Português do Sangue e da Transplantação de Coimbra e professor adjunto a tempo parcial do departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Prof. Doutor Armando José Cerejo Caseiro

professor adjunto e diretor do departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

agradecimentos

À minha família, pela ajuda preciosa, incentivo constante, apoio incondicional e pelos valores que me transmitiram durante toda a vida.

Ao meu namorado, pela compreensão, companheirismo e apoio que me deu durante todo o percurso de mestrado.

Ao meu orientador, o Dr. Artur Paiva, pelo estímulo, partilha de saber e apoio na elaboração desta dissertação, essenciais para a progressão deste estudo.

Ao meu co-orientador, o Dr. Artur Alves, pelo apoio e pela disponibilidade para me ajudar na elaboração deste trabalho.

À Dra. Cátia pelas amostras dos doentes e à Cell2B pela disponibilidade no envio das células mesenquimais do estroma.

À equipa que integra a Citometria de Fluxo do Instituto Português do Sangue de Coimbra e a todos os meus amigos que contribuíram para a concretização desta dissertação de mestrado.

Muito obrigada por acreditarem sempre em mim.

palavras-chave

Artrite Reumatóide, Sistema Imunitário, Imunomoduladora, Células Mesenquimais do Estroma, Células NK, TNF α , IFN γ .

resumo

O conhecimento crescente sobre a biologia das Células Mesenquimais do Estroma (MSCs) tem proporcionado o desenvolvimento de novas terapias celulares, especialmente na área reumatológica de etiologia auto-imune. Estas células exibem propriedades imunossupressoras, tendo a capacidade de suprimir a inflamação local e o dano do tecido numa grande variedade de doenças, em particular na Artrite Reumatóide (AR).

O objetivo do estudo foi analisar a ação imunomoduladora das MSCs derivadas da medula óssea na capacidade de produção de citocinas inflamatórias pelas células NK do sangue periférico em doentes com AR e comparar com os resultados obtidos nas mesmas células de indivíduos saudáveis.

O estudo envolveu amostras de sangue periférico de oito controlos e de doze doentes com AR. Para determinar a frequência de células NK a expressar TNF α e IFN γ por citometria de fluxo, realizaram-se co-culturas com células mononucleares do sangue periférico e MSCs, com posterior ativação *in vitro* com PMA e Ionomicina.

Na presença de MSCs observou-se, em ambos os grupos em estudo, uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de células NK a produzir TNF α e IFN γ , bem como na expressão destas proteínas por célula. Observou-se também uma correlação negativa entre a percentagem de inibição relativa à expressão de TNF α ou IFN γ nas células NK e o índice DAS da AR.

As MSCs inibem de forma eficiente a capacidade de produção de citocinas, nomeadamente TNF α e IFN γ pelas células NK, podendo desta forma contribuir para uma diminuição da inflamação e dos sintomas na AR.

keywords

Rheumatoid arthritis, immune system, immunomodulatory, Mesenchymal stromal cells, NK cells, TNF α , IFN γ .

abstract

The increasing knowledge about Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) biology has provided the development of new cell therapies, particularly in Rheumatology area of auto-immune etiology. These cells exhibit immunosuppressive properties, having the ability to suppress local inflammation and tissue damage, in a wide variety of diseases, in particular, Rheumatoid Arthritis (AR).

The objective of the study was to analyse the immunomodulatory action of bone marrow derived MSCs, in the ability of peripheral blood NK cells from patients with AR to produce inflammatory cytokines and compare the obtained results with those obtained from healthy individuals.

Twelve patients with AR and eight controls were enrolled in this study. We performed co-cultures with peripheral blood mononuclear cells and MSCs during 24 hours. After this period mononuclear cells were activated in vitro with PMA and Ionomycin in order to determine the frequency of NK cells producing TNF α or IFN γ , by flow cytometry.

In the presence of MSCs, it was observed, in both studied groups, a statistically significant decrease in the frequency of NK cells producing TNF α or IFN γ , as well as in the expression of both proteins at single cell level. It was also noticeable a negative correlation between the relative percentage of inhibition of TNF α or IFN γ expression in NK cells and the DAS index.

MSCs inhibit, in an efficient way, the ability of cytokine production, namely TNF α and IFN γ by NK cells, and therefore contributing to the decrease of inflammation and AR symptoms.

Índice

1-Introdução	15
1.1-Artrite Reumatóide	15
1.1.1-Definição Artrite Reumatóide	15
1.1.2-Diagnóstico e critérios para caracterização da AR.....	16
1.1.3-Caracterização da doença	18
1.1.4-Fisiopatologia da AR.....	18
1.1.5-AR e o sistema imune.....	20
1.1.6-MSCs na AR.....	21
1.1.6.1-Defeito sinovial	21
1.1.6.2-MSCs nos Tecidos Sinovial em AR	22
1.1.6.3-O impacto da inflamação nas propriedades das MSCs.....	22
1.2-Células Mesenquimais do Estroma	23
1.2.1-Definição de MSCs.....	23
1.2.2-Origem e fontes das MSCs	25
1.2.3-Imunomodulação pelas MSCs	26
1.2.4-Perspetivas terapêuticas baseadas nas MSCs em AR.....	28
1.3-As Células do Sistema Imunológico	29
1.3.1-Linfócitos.....	31
1.4-Células NK	32
1.4.1-Caracterização das células NK	32
1.4.2-Subpopulações de células NK	34
1.4.3-Funções.....	35
1.4.4-Recetores das células NK	36
1.4.5-Células NK na AR	38

1.5-Objetivos	40
2-Material e Métodos	41
2.1-Material.....	41
2.2-Procedimentos	42
2.2.1-Amostras Biológicas.....	42
2.2.2-Purificação e co-cultura com células mononucleares (MNC) do sangue periférico e isolamento de MSCs	43
2.3-Identificação e quantificação de linfócitos NK	44
2.4-Citometria	45
2.5-Análise Estatística	45
3-Resultados	46
3.1-Frequência de células NK a produzir TNF α com e sem contacto com MSCs-MO e expressão desta proteína por célula.....	46
3.2-Frequência de células NK a produzir IFN γ com e sem contacto com MSCs-MO e expressão desta proteína por célula.....	47
3.3-Comparação da percentagem de inibição para a percentagem de células NK a produzir citocinas em estudo, bem como da expressão das mesmas.....	49
3.4-Correlação entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de TNF α ou IFN γ e o índice DAS	50
3.5-Correlação entre a percentagem de inibição relativa à expressão das citocinas TNF α ou IFN γ nas células NK e o índice DAS	51
4-Discussão	52
5-Conclusão	55
6-Referências Bibliográficas	56

Índice de figuras

- Figura nº1: Esquema de uma articulação normal em comparação com uma articulação com artrite reumatóide**, onde se pode observar erosão óssea, a membrana sinovial inflamada e a formação do *pannus* com várias células do sistema imune.....15
- Figura nº2: Fisiopatologia da AR.** Na fisiopatologia da AR o TNF α é produzido em elevadas concentrações por várias células, devido a estímulos endógenos ou microbianos, levando a uma cascata de rede e de respostas celulares mediadas por TNF α19
- Figura nº3: Modelo para destruição do osso na AR.** Neste esquema simplista, um antígeno desconhecido desencadeou o processo auto-imune, principalmente através de células T auto-reativas, que estimulam ainda mais a resposta imune ativando as células B e recrutando monócitos e macrófagos. As células T ativadas mantêm a inflamação e indiretamente provocam danos no tecido, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como as MMPs e o TNF α por monócitos, macrófagos e FLS. As MSCs-MO podem contribuir para a reparação do osso e da cartilagem mas o potencial proliferativo da célula é afetado pelo microambiente inflamatório da medula.....21
- Figura nº4: Diferenciação das MSCs.** A partir desta figura verifica-se que as MSCs dividem-se noutros tipos de células e estas noutras e assim sucessivamente.....24
- Figura nº5: Representação esquemática das interações entre MSCs e células imunes.** Depois da ativação, as MSCs secretam mediadores solúveis, como a IDO, PGE₂, IL-6 e HLA-G. A produção destes mediadores regula a proliferação e função de células imunes.....25
- Figura nº6: Imunomodulação: Mecanismo de interação entre MSCs e resposta específica aos alo-antígenos.** As MSCs são imunorreguladoras porque segregam grandes quantidades de agentes bioativos. Esses agentes causam o silenciamento ou inibição de respostas de células T e NK.....26
- Figura nº7: Efeitos imunomoduladores das MSCs.** As MSCs são capazes de modular a função imune de diferentes células *in vitro*, particularmente envolvendo a supressão da proliferação de células T, NK e diferenciação de CDs..... 27
- Figura nº8: MSCs no tratamento da AR.** As MSCs podem contribuir para o tratamento de AR pela supressão local e sistémica de respostas imunes e podem promover a formação de cartilagem e osso através dos seus efeitos de reparação e diferenciação dos tecidos.... 29

Figura nº9: Modelo da hematopoiese. Este esquema resume vários modelos descritos para a hematopoiese e estão indicados alguns fatores solúveis envolvidos neste processo e as vias de diferenciação das diferentes células sanguíneas mais conhecidas.....	30
Figura nº10: Representação gráfica da frequência de células NK produtoras de TNF α , após estimulação com PMA e Ionomicina com e sem contacto com MSCs, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR. *)Sem MSCs <i>versus</i> Com MSCs, $p < 0,05$	46
Figura nº11: Representação gráfica da expressão de TNF α , dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) nas células NK em ambos os grupos em estudo, com e sem contacto com MSCs. *)Sem MSCs <i>versus</i> Com MSCs, $p < 0,05$	47
Figura nº12: Representação gráfica da frequência de células NK produtoras de IFN γ , após estimulação com PMA e Ionomicina com e sem contacto com MSCs, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR. *)Sem MSCs <i>versus</i> Com MSCs, $p < 0,05$	48
Figura nº13: Representação gráfica da expressão de IFN γ , dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) nas células NK em ambos os grupos em estudo com e sem contacto com MSCs. *)Sem MSCs <i>versus</i> Com MSCs, $p < 0,05$	48
Figura nº14: Representação gráfica dos resultados da percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de IFN γ ou TNF α	49
Figura nº15: Representação gráfica dos resultados da percentagem de inibição relativa à MIF de IFN γ ou TNF α nas células NK.....	49
Figura nº16: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de TNF α e o índice DAS.....	50
Figura nº17: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de IFN γ e o índice DAS.....	50
Figura nº18: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à expressão de TNF α nas células NK e o índice DAS.....	51
Figura nº19: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à expressão de IFN γ nas células NK e o índice DAS.....	51

Índice de tabelas

Tabela 1- Atividade da doença Artrite Reumatóide – Índice DAS.....	18
Tabela 2- Principais citocinas envolvidas e suas funções.....	32
Tabela 3- Principais diferenças fenotípicas e funcionais de células NK.....	34
Tabela 4- Principais famílias de recetores de células NK.....	37
Tabela 5- Caracterização da população em estudo.....	42

Abreviaturas

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
APC	Células apresentadoras de antígenos
anti-CCP	Anticorpo antipeptídeo citrulinado
AR	Artrite Reumatóide
CDs	Células Dendríticas
CIA	Artrite induzida por colagénio
DAS28	Escala da atividade da doença 28
DO	Densidade ótica
EAE	Encefalite auto-imune experimental
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
FasL	Fas ligando
FR	Fator reumatóide
GM-CSF	Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos
GvHD	Doença do enxerto contra hospedeiro
HAQ	Questionário de Avaliação de Saúde
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA	Antígeno leucocitário humano
IDO	Indolamina – 2,3 dioxigenase
IFN	Interferão

IL	Interleucina
mAb	Anticorpos monoclonais
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MMPs	Metaloproteinases
MNC	Células mononucleares
MO	Medula óssea
MSCs	Células mesenquimais do estroma
NK	Natural Killer
PG	Prostaglandina
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
RANKL	Ligando do recetor do fator nuclear kB
SJC	Contagem de articulações inchadas
SP	Sangue periférico
TCR	Recetor da célula T para o antígeno
TGF	Fator de crescimento transformante
Th	Células T auxiliares
TJC	Contagem de articulações tumefactas
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligando indutor de apoptose relacionado com TNF
Tregs	Células T reguladoras

1-Introdução

1.1-Artrite Reumatóide

1.1.1- Definição Artrite Reumatóide

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória articular sistêmica, crônica e erosiva que afeta principalmente as articulações. Está associada com a produção local de mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) α e a interleucina (IL)-1 β e pode afetar outros órgãos e sistemas, como o cardiovascular, o nervoso, a pele, os pulmões, os olhos e os rins. É considerada uma das doenças auto-ímmunes mais frequentes, com distribuição universal, afetando aproximadamente 1% da população mundial. Esta doença tem mostrado uma maior incidência nos últimos anos, sendo que o gênero feminino é afetado três vezes mais comparado com o masculino, com um pico entre os 35 e os 45 anos (Figura 1) (1–10).

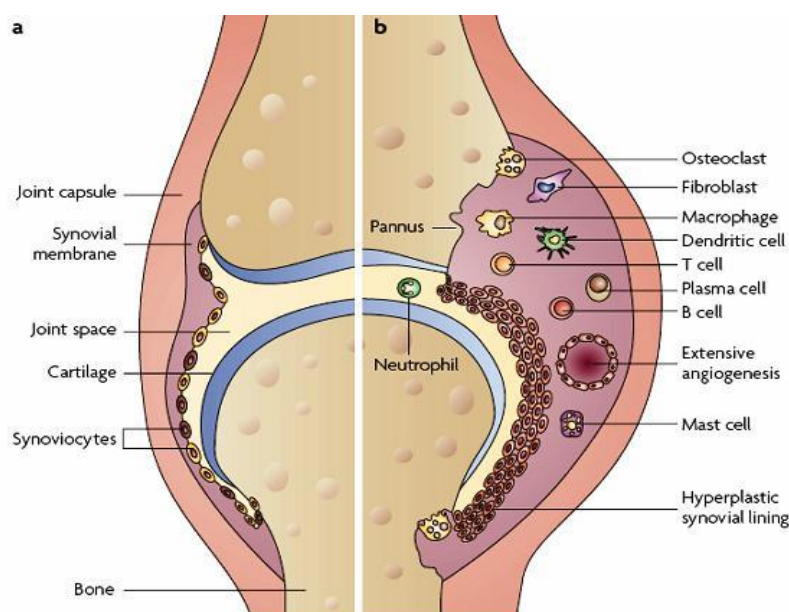


Figura nº1 - Esquema de uma articulação normal em comparação com uma articulação com artrite reumatóide, onde se pode observar erosão óssea, a membrana sinovial inflamada e a formação do pannus com várias células do sistema imune, adaptado do Strand *et al.*, 2007.

A AR é uma doença auto-ímmune e inflamatória crônica que não está limitada apenas às articulações mas também é associada a sinais sistêmicos inflamatórios, incluindo o aumento da velocidade de sedimentação, da proteína C reativa e de citocinas pró-inflamatórias, no sangue periférico (SP) (11).

Esta é uma doença debilitante levando ao aumento da morbidade e mortalidade, sendo por isso necessárias novas terapêuticas. O tratamento da AR deve ser iniciado o mais rapidamente possível e difere de pessoa para pessoa, consoante a idade e a gravidade das perturbações. Embora não exista uma cura definitiva, há muitas substâncias que podem mantê-la sob controlo abrandando o processo inflamatório. Existem atualmente intervenções farmacológicas que ajudam a reduzir a inflamação, incluindo o metotrexato e os anticorpos monoclonais anti-TNF α , como o infliximab, adalimumab e etanercept. Mais recentemente, para pacientes que não respondem ao tratamento convencional, a infusão de células mesenquimais autólogas tornou-se uma opção (12,13).

1.1.2-Diagnóstico e critérios para caracterização da AR

As manifestações articulares da AR podem ser reversíveis na fase inicial, no entanto, em fases mais avançadas ocorre destruição articular, óssea e da cartilagem, imobilização e alterações musculares, tendinosas e ligamentosas, que são irreversíveis. A característica básica da manifestação articular da AR é a inflamação da sinóvia (sinovite). Os doentes com AR queixam-se de dor, de inchaço e de limitação dos movimentos das articulações afetadas. No exame físico, observa-se presença de dor, aumento de volume das articulações, derrame intra-articular, calor e, eventualmente, rubor. No entanto, em relação às articulações profundas, como os quadris e ombros, pode não ser tão evidente a presença de sinais da doença (14).

Para que a doença não apresente efeitos prejudiciais é essencial uma intervenção precoce e apropriada nas fases iniciais da doença. Esta fase é definida durante as primeiras 6 a 12 semanas de sintomatologia, um período crítico de janela de oportunidade terapêutica na qual uma intervenção adequada poderá modificar o curso da doença, com melhoria do seu prognóstico (15). Assim, é fundamental determinar marcadores serológicos ou genéticos que permitam verificar quais os doentes que evoluem para a doença e que precisam de terapia apropriada, mais ou menos agressiva, para diminuir a probabilidade de desenvolver doença persistente ou lesões erosivas (16).

A classificação anterior da AR era essencialmente baseada nos critérios introduzidos pelo ACR em 1987 e não apresentavam boa *performance* na AR inicial. Os critérios classificatórios para AR do ACR foram desenvolvidos com base em indivíduos com AR e apresentava uma sensibilidade de 91-94% e especificidade de 89%. Os critérios incluem características menos frequentes da AR, como alterações radiográficas (erosões) e nódulos

reumatóides, sendo considerados subótimos para a identificação de indivíduos com AR inicial, apresentando uma sensibilidade de 40-90% e especificidade de 50-90%. Assim sendo, tornou-se necessário o estabelecimento de novos critérios de classificação para a AR, para que se possa tratar a doença na sua fase precoce e com maior sensibilidade e especificidade (17).

Os novos critérios da ACR/EULAR de 2010 não são diagnósticos mas sim classificatórios e a sua função é basicamente definir populações homogêneas (13,17,18).

Em Abril de 2010, num estudo colaborativo entre o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e a Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) propuseram uma classificação para a AR baseando-se em seis critérios. Dois dos critérios são considerados essenciais, sendo eles a evidência de sinovite em pelo menos uma articulação e a inexistência de uma etiologia específica para a mesma (19). Os restantes critérios são os seguintes: forma e extensão do atingimento articular; serologia, como o fator reumatóide (FR) e o anticorpo antipeptídeo citrulinado (anti-CCP); parâmetros inflamatórios de fase aguda, como a velocidade de sedimentação e a proteína C reativa e a duração de sinovite. O diagnóstico da doença deverá ser efetuado com uma contagem igual ou superior a 6 (nos possíveis 10 pontos). A contagem das articulações pode utilizar diferentes métodos de imagem, como a ultrassonografia e a ressonância magnética. No entanto, é importante frisar que se o paciente apresentar uma história compatível com AR, mesmo que não documentada e com erosões radiográficas típicas pode-se proceder diretamente à classificação como AR, independentemente do preenchimento dos critérios (20–28).

A compreensão da fisiopatogenia da AR, os métodos para o seu diagnóstico e a administração terapêutica sofreram consideráveis avanços nos últimos anos, destacando-se a importância dada ao período inicial da doença, a chamada AR inicial. Apesar destes avanços, os indicadores diagnósticos e prognósticos atuais (clínicos, laboratoriais e radiográficos) têm um valor restrito para o diagnóstico precoce e estabelecimento do prognóstico individual (29).

Para quantificar e avaliar a evolução da AR, foram desenvolvidos diversos instrumentos metrológicos, entre os quais os critérios de resposta do ACR, uma pontuação de atividade da doença (DAS), instrumentos de avaliação da capacidade funcional, como o questionário de avaliação de saúde (HAQ) e a avaliação radiológica pelo *score* de Sharp modificado por van der Heidje. O índice DAS mede a atividade da doença em pacientes

com AR, é de fácil utilização e percepção e para o seu cálculo são utilizadas 4 variáveis: número de articulações dolorosas e tumefactas, valor da velocidade de sedimentação e o grau de comprometimento causado pela doença, por meio de uma escala analógica visual, preenchida pelo doente. O índice avalia 28 articulações, incluindo os ombros, os cotovelos, os punhos, as articulações metacarpo-falângicas e as inter-falângicas proximais e os joelhos. A avaliação da atividade clínica usando o DAS28 define que há remissão da AR quando a sua pontuação é inferior a 2,6, existe atividade ligeira da doença de 2,6 a 3,2 pontos, atividade moderada de 3,2 a 5,1 e atividade intensa acima de 5,1 pontos. A pontuação máxima do índice DAS28 é 10 (Tabela 1) (17).

Tabela 1- Atividade da doença Artrite Reumatoide – Índice DAS, podendo ser dividida em 4 níveis: remissão, baixa, moderada e alta, modificado a partir de Aletaha *et al.*, 2010.

Índice	Estado da atividade da doença	Pontuação
DAS28	Remissão	≤ 2,6
	Baixa	> 2,6 e ≤ 3,2
	Moderada	> 3,2 e ≤ 5,1
	Alta	> 5,1

1.1.3- Caracterização da doença

Embora a etiologia da AR permaneça desconhecida, houve nos últimos anos avanços consideráveis na compreensão da sua etiopatogenia. Vários fatores podem estar envolvidos na AR sem que nenhum seja prevalente e responsável único pela patologia, o que significa que é de causa multifatorial (29–34). Esta causa pode ser devido a indivíduos geneticamente predispostos para a doença, a fatores ambientais e hormonais específicos, podendo ativar reações imunes potencialmente patogénicas e levando à formação de auto-anticorpos. Ao mesmo tempo, fatores socioeconómicos, psicológicos e o próprio estilo de vida podem influenciar a evolução mais ou menos insidiosa e o prognóstico da doença (11,35).

1.1.4- Fisiopatologia da AR

Nesta doença auto-imune ocorre tipicamente um processo inflamatório devido à migração de células sanguíneas e de mediadores inflamatórios para o interior das articulações, resultando em hiperplasia sinovial (Figura 2).

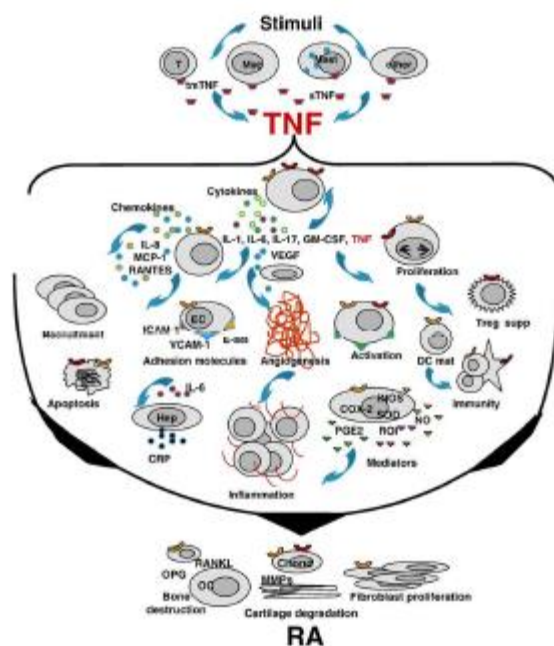


Figura nº2: Fisiopatologia da AR. Na fisiopatologia da AR o TNF α é produzido em elevadas concentrações por várias células, devido a estímulos endógenos ou microbianos, levando a uma cascata de rede e de respostas celulares mediadas por TNF α , adaptado de Tracey *et al.*, 2008.

Pannus é a designação do tecido inflamatório neoformado, a partir da membrana sinovial de uma articulação. Este tecido vai crescer sobre a cartilagem articular, revestindo-a e ligando-se a ela de tal forma que não é possível ser destacada. A invasão da cartilagem pelo *pannus* leva à degradação do colagénio tipo II por metaloproteinases (MMPs) e por outras enzimas produzidas pelas células sinoviais e condrócitos quando estimulados por citocinas, como o TNF α , a IL-1, a IL-6, a IL-17 e a oncostatina. As MMPs-1 são proteinases chave que medeiam a ação do *pannus* na cartilagem. Além do colagénio tipo II, o proteoglicano agrecan é outro importante componente da cartilagem. Este confere à cartilagem propriedades de resistência à compressão, mantendo as moléculas de água nos tecidos. Na AR há diminuição do agrecan na cartilagem devido à ação de agrecanases. Além da invasão de toda a articulação, o *pannus* invade também outros tecidos, como os ligamentos, os tendões e o osso (36).

As erosões ósseas são um processo irreversível que ocorre precocemente na AR. Nesta doença, o equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea está alterado, com aumento da reabsorção. Esta é mediada pelos osteoclastos, que são células multinucleadas e que existem em grande quantidade no *pannus* sinovial da articulação afetada (26,36).

Os efeitos dos osteoclastos são reforçados pelo TNF α , IL-1, IL-6, IL-17 e inibidos pelo interferon (IFN) γ e IL-4. O TNF α é o mais potente estimulador da diferenciação dos osteoclastos. O envolvimento do sistema imune na patogênese da AR não é limitado à inflamação. As células B e T desempenham um papel importante na progressão da doença, evidenciado por estudos no fluido sinovial ou pelas subpopulações linfocitárias da membrana sinovial. Por exemplo, a terapia com inibidores do TNF α e com depleção de células B pode beneficiar muitos pacientes com AR. Contudo, nenhuma destas duas terapêuticas faz com que ocorra remissão completa da doença, e por isso, é importante desenvolver novas e mais efetivas terapias para a AR (12,21,26,37).

1.1.5-AR e o sistema imune

A AR afeta o sistema imunitário que habitualmente protege o indivíduo contra infecções e outras doenças. No entanto, devido ao aparecimento desta doença ocorre ativação duma cascata de acontecimentos, causando inflamação e destruição de tecidos saudáveis do organismo, especificamente do tecido sinovial. A AR faz com que a membrana sinovial inflame, aumente de espessura e com o tempo destrua outros tecidos da articulação. A dimensão anormal da membrana sinovial e a destruição articular que a acompanha podem provocar dor e deformidades. À medida que a doença vai progredindo, a dor, a destruição articular e a perda de movimentos podem diminuir a capacidade funcional e comprometer a qualidade de vida (19,38,39).

Na AR estão envolvidas moléculas que ajudam a perpetuar o estado inflamatório e outras que, pelo contrário, têm um efeito protetor no processo patogénico, o qual se processa fundamentalmente no meio sinovial, apesar das repercussões sistémicas inerentes à doença. Os linfócitos, os macrófagos, os fibroblastos, as células endoteliais e os osteoclastos são os protagonistas no processo da inflamação sinovial (9,15,25,29).

As citocinas mais importantes na perpetuação da AR são a IL-2 e as MMPs. A IL-2 permite a proliferação dos linfócitos Th1, estimula a diferenciação dos linfócitos B e conseqüentemente a produção de anticorpos. O IFN γ promove a ativação dos monócitos/macrófagos e aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que as MMPs apresentam grande potencial para a destruição das estruturas articulares. Existe ainda o TNF α , que é um marcador primário das doenças inflamatórias e induz a proliferação de fibroblastos, estimula a expressão de molécula de adesão intercelulares e

aumenta a atividade citolítica das células Natural Killer (NK), para além de ativar e induzir a diferenciação e proliferação dos linfócitos T (26,40,41).

1.1.6-MSCs na AR

1.1.6.1-Defeito sinovial

Os linfócitos T são a chave dos componentes celulares no processo auto-imune. Especificamente, as células T CD4⁺ ativadas estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais (FLS) para produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β , a IL-6, o TNF α e as MMPs. A inflamação é iniciada nas articulações e avança para a cartilagem e osso subjacente. A cartilagem é invadida por FLS com elevada proliferação que causam a destruição da cartilagem devido à produção de MMPs e os osteoclastos vão danificar ainda mais a cartilagem e o osso. O dano tecidual é acelerado devido ao processo inflamatório ou autoreativo subjacente e também pela ineficácia da regeneração do tecido, causando a destruição da articulação (Figura 3) (36).

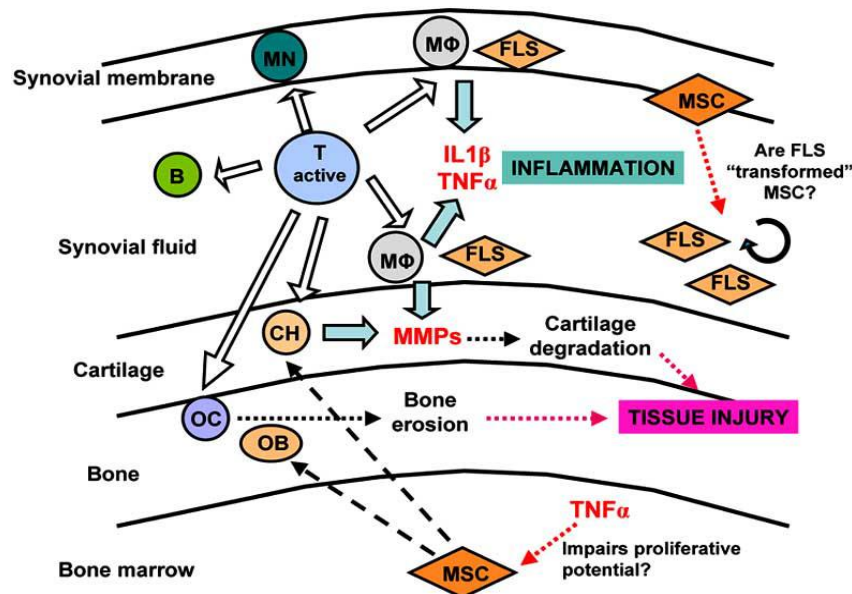


Figura nº3: Modelo para destruição do osso na AR. Neste esquema simplista, um antígeno desconhecido desencadeou o processo auto-imune, principalmente através de células T auto-reativas, que estimulam ainda mais a resposta imune ativando as células B e recrutando monócitos e macrófagos. As células T ativadas mantêm a inflamação e indiretamente provocam danos no tecido, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como as MMPs e o TNF α por monócitos, macrófagos e FLS. As MSCs-MO podem contribuir para a reparação do osso e da cartilagem mas o potencial proliferativo da célula é afetado pelo microambiente inflamatório da medula, adaptado de Kastrinaki *et al.*, 2009.

O TNF α é um mediador da lesão dos tecidos locais e de manifestação sistêmica da AR, e, por isso, a citocina tem sido considerada como a chave-alvo para terapias biológicas anti-artrite. Muitos pacientes com AR respondem favoravelmente ao tratamento anti-TNF α , levando à diminuição da inflamação e melhoria dos sintomas locais e sistêmicos. Recentemente, têm surgido estudos baseados na terapia celular com MSCs, usando a engenharia dos tecidos adequada para que ocorra a formação de osso e de cartilagem ou usando células com capacidade para recrutar e/ou induzir as MSCs, para que ocorra reconstrução do esqueleto (36).

1.1.6.2-MSCs nos Tecidos Sinovial em AR

O recrutamento ou influxo das células T, B e NK para as articulações afetadas podem originar uma resposta patológica responsável pela lesão dos tecidos locais. Por este motivo tem sido sugerido que as MSCs da MO são recrutadas para as articulações inflamadas, fruto da inflamação aí gerada, melhorando gradualmente a membrana sinovial dos doentes (36).

É sugerido que as MSCs-MO são recrutadas para a articulação inflamada através de canais que ligam o osso e as articulações, e gradualmente a membrana sinovial volta à normalidade. Em modelos animais com AR, foi mostrado que os FLS se encontram aumentados devido às MSCs-MO, e que estas potenciam a diferenciação dos FLS para adipócitos e para osso.

1.1.6.3-O impacto da inflamação nas propriedades das MSCs

Normalmente as MSCs apresentam funções imunossupressoras e imunorreguladoras e escapam ao reconhecimento por parte do sistema imune, expressando moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe I e não expressando moléculas MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias. Elas inibem a proliferação de células T e B e promovem a diferenciação das células T em células Tregs. Inibem a produção de TNF α pelas células dendríticas (CDs) mielóides, aumentam a produção de IL-10 a partir de CDs plasmacitóides, diminuem a produção de IFN γ pelas células Th1 e células NK e aumentam a libertação de IL-4 pelas células Th2. As MSCs inibem também a maturação efetiva das CDs inibindo a expressão de moléculas co-estimulatórias, como o CD40 e o CD86, de moléculas de MHC de classe I e II e de CCR7 que permite que as CDs migrem para os

órgãos linfóides secundários. A imunorregulação das MSCs é principalmente mediada por fatores solúveis, mas também devido a interações por contacto célula a célula. O fator de crescimento de hepatócitos (HGF), a IL-10, o fator de crescimento transformante (TGF)- β 1, a indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), as prostaglandinas (PG) e o óxido nítrico foram reconhecidas como moléculas responsáveis pela imunorregulação (42).

Estudos anteriores demonstram que o ambiente inflamatório pode alterar as propriedades imunorreguladoras das MSCs (42,43). O IFN γ parece induzir um aumento da expressão de moléculas do MHC em MSCs, mas também estimula a produção de HGF, IL-10, TGF- β 1 e IDO, potenciando a sua capacidade imunossupressora. Existem estudos que demonstram que as MSCs derivadas da MO de doentes com AR apresentam propriedades de imunossupressão similares às de indivíduos saudáveis apontando para a possibilidade da utilização de MSCs autólogas para terapia celular (43).

No entanto, tem sido relatado que tanto o TNF α como a IL-1 β inibem a diferenciação das MSCs para algumas linhagens, o que pode comprometer o seu potencial regenerativo (27,36,43,44).

1.2-Células Mesenquimais do Estroma

1.2.1-Definição de MSCs

As MSCs têm diversas características que as distinguem de outros tipos de células (Figura 4). São consideradas células multipotentes, apresentam capacidade de diferenciação em diferentes linhas germinativas e de auto-renovação. A Sociedade Internacional de Terapia Celular divulgou recentemente uma declaração de consenso sobre a nomenclatura e definição destas células, sendo hoje chamadas de células mesenquimais do estroma. Estas células são definidas de acordo com três critérios: capacidade de aderir ao plástico, por expressarem os marcadores de superfície celular CD73, CD90 e CD105 e não expressarem CD11b, CD14, CD34, CD45 e antigénio leucocitário humano (HLA)-DR e pela sua capacidade de se diferenciarem em, pelo menos, três linhagens mesenquimais, nomeadamente em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (13,28,45,46).

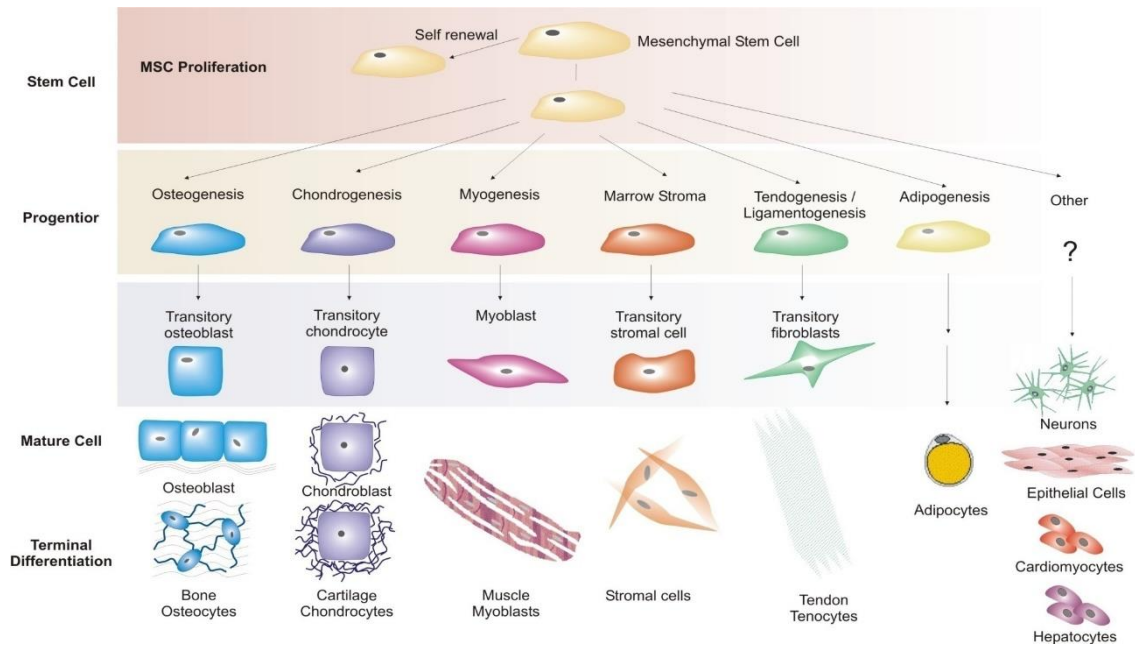


Figura nº4: Diferenciação das MSCs. A partir desta figura verifica-se que as MSCs dividem-se noutros tipos de células e estas noutras e assim sucessivamente, adaptado de Caplan e Bruder, 2007.

As MSCs são células que derivam da mesoderme e residem no estroma, funcionando como precursores de tecidos de conexão não hematopoiéticos.

Em condições patológicas, como a lesão de tecidos, estas células são mobilizadas para o local do dano. O dano é geralmente acompanhado por libertação de fatores pró-inflamatórios, produzidos pela resposta imune inata e adaptativa, que promovem a migração e ativação das MSCs.

As MSCs demonstram ter um grande potencial terapêutico em modelos pré-clínicos de doenças inflamatórias e, por isso, são células ideais para a engenharia tecidual e terapia celular para a reparação de erros estruturais, como os que ocorrem em várias condições de artrite (Figura 5) (48). Em modelos animais, as MSCs foram extensivamente estudadas nas seguintes doenças: doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD), encefalite auto-imune experimental (EAE), artrite induzida por colagénio (CIA), doença inflamatória do intestino (DII), diabetes do tipo 1 e lúpus eritematoso sistémico (LES) (28,45,47).

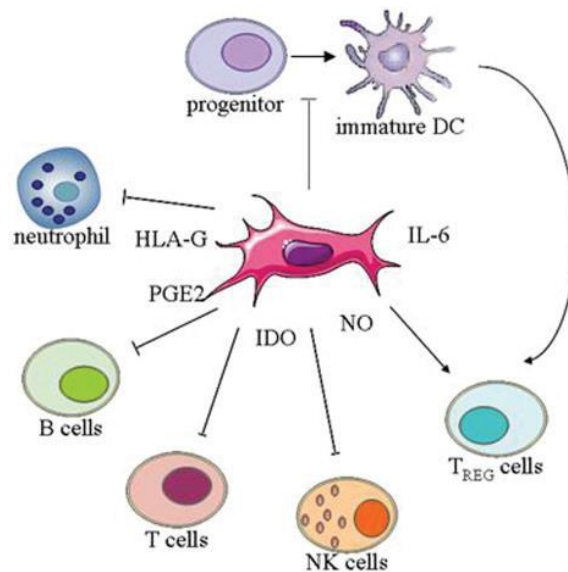


Figura nº5: Representação esquemática das interações entre MSCs e células imunes. Depois da ativação, as MSCs secretam mediadores solúveis, como a IDO, PGE₂, IL-6 e HLA-G. A produção destes mediadores regula a proliferação e função de células imunes, adaptado de Ghannam *et al.*, 2010.

As MSCs podem ser administradas por diversas vias, sendo as mais utilizadas a intravenosa e a intraperitoneal. Estudos sugerem que a infusão destas células por estas duas vias faz com que as MSCs migrem preferencialmente para o baço. No entanto, estudos mais recentes utilizam a administração intra-articular de MSCs podendo esta ser mais benéfica do que a via intravenosa ou intraperitoneal, aplicando-as diretamente nos tecidos afetados, particularmente no caso das doenças reumáticas (42,46,48). De facto, estudos indicam que a administração intra-articular, leva à redução do inchaço das articulações e da destruição da cartilagem, em doentes com artrite induzida por antigénio (AIA) em ratos (49). Assim, a causa para a existência de diferentes efeitos das MSCs pode ser a via de administração.

1.2.2-Origem e fontes das MSCs

As MSCs têm origem principalmente na MO. No entanto, tornou-se recentemente claro que as MSCs também estão presentes em diversos outros tecidos. Assim, estas células podem ser isoladas a partir do perióstio, do músculo, da membrana sinovial, do líquido sinovial, do fígado, do sangue do cordão umbilical, da gordura, entre outros. No entanto, a origem das MSCs influencia qual o seu fenótipo e as suas propriedades funcionais (42,46).

1.2.3-Imunomodulação pelas MSCs

As MSCs podem exercer imunossupressão, através da inibição das células T, da proliferação celular, da diferenciação das células B para células produtoras de anticorpos, da maturação das células dendríticas e da atividade citotóxica das células NK.

Toda a atividade do sistema imune pode ser estimulada ou suprimida, processo conhecido como imunomodulação (Figura 6 e 7). Este processo altera o sistema imune e interfere nas funções fisiológicas do mesmo, apresentando como resultado o aumento ou a supressão da resposta imune inata e adaptativa.

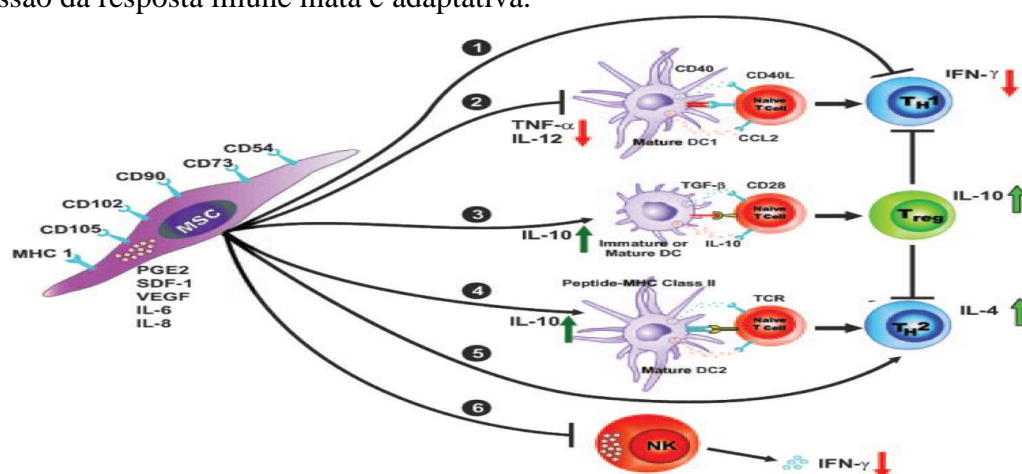


Figura nº6: Imunomodulação: Mecanismo de interação entre MSCs e resposta específica aos alo-antígenios. As MSCs são imunorreguladoras porque segregam grandes quantidades de agentes bioativos. Esses agentes causam o silenciamento ou inibição de respostas de células T e NK, adaptado de Caplan *et al.*, 2007.

As MSCs podem influenciar vários processos fisiológicos e fisiopatológicos. Considerando a necessidade de controlo e equilíbrio entre as atividades estimuladoras e supressoras do sistema imune, a identificação e caracterização de células com atividades imunorreguladoras tem-se apresentado como área de interesse científico. Assim, o efeito de extratos, frações e compostos obtidos de plantas sobre a atividade do sistema imune tem sido um dos focos de estudos dos investigadores na área de fitofármacos tendo sido utilizada em modelos *in vivo* como *in vitro* (50–52).

A imunomodulação requer a ativação preliminar de MSCs por citocinas inflamatórias, como o IFN γ , TNF α , a IL-1 α ou a IL-1 β (45,53,54).

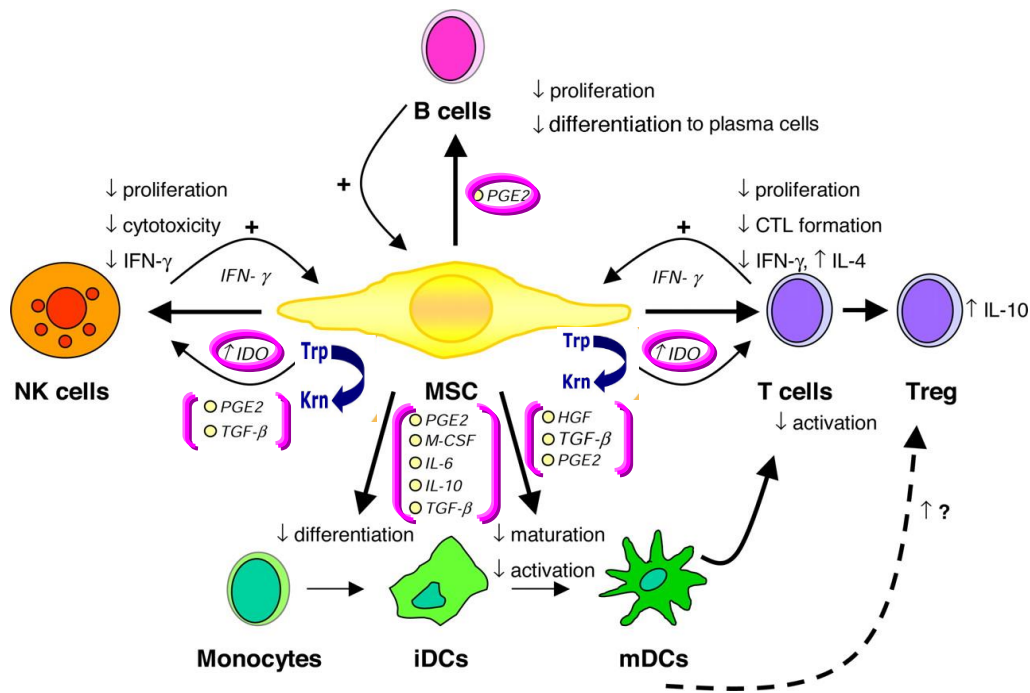


Figura nº7: Efeitos imunomoduladores das MSCs. As MSCs são capazes de modular a função imune de diferentes células *in vitro*, particularmente envolvendo a supressão da proliferação de células T, NK e diferenciação de CDs, adaptado de Nauta *et al*, 2007.

As MSCs exercem um forte efeito inibidor sobre a proliferação de células T, efeito relativamente menor e reversível sobre a função efetora das células T (medido pela produção de IFN γ) e diminuem a ativação das células T (com base na expressão de superfície de CD25 e CD69) (27,42,45,49).

As MSCs-MO mostram um potencial para a supressão de células T auto-reativas *in vitro*, reduzindo os níveis de IFN γ , IL-4, IL-10 e TNF α e aumentando a proporção de células Tregs.

Vito Pistoia salientou que as MSCs também exercem a sua ação nas células B. *In vitro*, a proliferação de células B é inibida pelas MSCs, com uma inibição máxima a ser alcançada com um rácio células B/MSCs de 1:1. Diversos fatores solúveis estão envolvidos nesta inibição das células B, que induzem bloqueio no ciclo celular nas fases G₀/G₁, semelhantes ao observado nas células T.

As MSCs alteram a expressão de moléculas de superfície envolvidas na co-estimulação das células T, como o HLA-DR, CD40 e moléculas da família B7 nas células apresentadoras de antígeno (27,42,45,49).

Willem Fibbe e Dazzi e colaboradores mostraram que as MSCs também inibem a diferenciação de monócitos em CDs imaturas. Aggarwal e Pittenger também

demonstraram que as MSCs inibem a maturação das CDs, tornando-as tolerogénicas, induzindo anergia nas células T ou a diferenciação das células T em Tregs (13,28,36,44).

As MSCs inibem *in vitro* a diferenciação de monócitos e de células hematopoiéticas CD34⁺ em CDs, devido à diminuição da expressão na superfície da célula de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias, bem como à diminuição da produção de IL-12 e de TNF α , sendo este efeito mediado pela IL-6 ou PGE₂ (42,48).

Tem sido sugerido, também, que a função das células NK é afetada pelas MSCs, devido à regulação negativa de secreção do IFN γ , defendido por dados *in vitro* relatados por Le Blanc, que sugerem que as células NK e os linfócitos T citotóxicos (CTL) efetores são inibidos pelas MSCs (41). O contato célula a célula e a libertação de fatores solúveis, como o TGF- β e a PGE₂ parecem ser responsáveis por este efeito inibitório (13,46). A inibição da produção de IL-2 pelas células Th também induzem indiretamente uma diminuição da proliferação das células NK.

Estudos recentes sugerem que as MSCs exercem dois níveis de ação. O primeiro nível ocorre localmente através da secreção de mediadores solúveis que inibem a proliferação de células imunes. O segundo nível induz uma resposta sistémica, ou um perfil imune anti-inflamatório Th2, devido à diferenciação de células Tregs (11,45,49).

Para além dos fatores solúveis libertados pelas MSCs, estas possuem outras vias de regulação da função de células T. As MSCs expressam na sua membrana moléculas indutoras da morte celular, como a PD-1 que ao ligar-se aos seus recetores nas células T, PD-L1 e PD-L2 induzem a apoptose nestas células (42,48).

1.2.4-Perspetivas terapêuticas baseadas nas MSCs em AR

As MSCs podem ser usadas em diferentes estratégias na AR. Podem ser usadas MSCs autólogas ou alogénicas e pela indução de MSCs locais adequadas promovem a regeneração da cartilagem e do osso, o que pode aliviar a artrite através da produção de fatores imunossupressores. Por exemplo, as MSCs expressam vários fatores que influenciam a reparação do esqueleto, tal como a proteína morfogenética óssea (BMP)-2, a BMP-4 ou o TGF- β 1, causando regeneração de cartilagem e de osso (55).

Uma abordagem alternativa pode ser também o local de administração das MSCs. A administração local de MSCs, em vez de sistémica, parece ser a maneira mais adequada para lidar com defeitos no osso e cartilagem.

Em relação à AR, dois estudos relacionados foram descritos até agora. O primeiro

estudo implica a administração de uma linha celular imortalizada de células MSCs e que não resultou em qualquer efeito benéfico num modelo de rato. No entanto no segundo estudo, a administração de MSCs da MO preveniu ou tratou a doença (13,27,36,56).

Em conclusão, o uso de MSCs para a reparação da cartilagem e do osso é uma área muito interessante e promissora de pesquisa. No entanto, ainda existe limitação quanto às propriedades biológicas e aos mecanismos de ação das MSCs. Continuam também a existir muitas perguntas sem resposta, preocupações e campos abertos para pesquisa (Figura 8) (36).

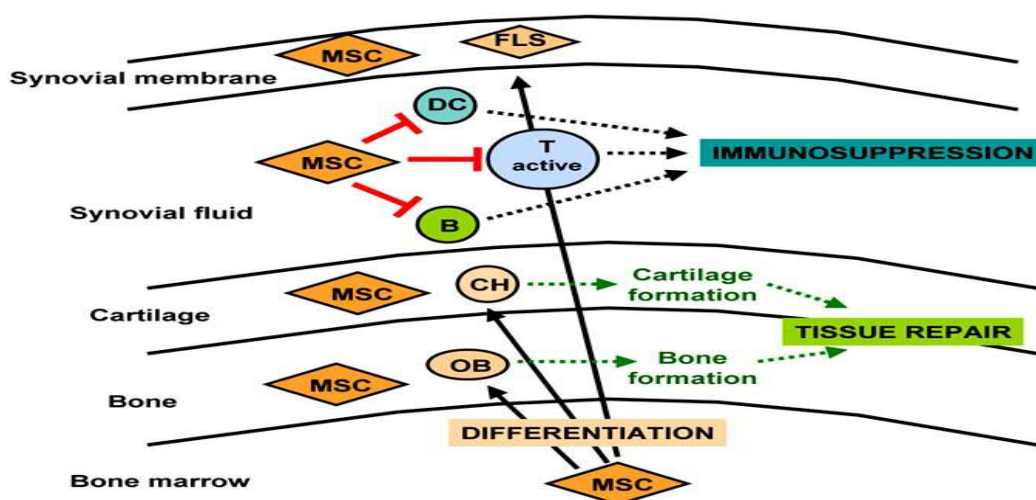


Figura nº8: MSCs no tratamento da AR. As MSCs podem contribuir para o tratamento de AR pela supressão local e sistémica de respostas imunes e podem promover a formação de cartilagem e osso através dos seus efeitos de reparação e diferenciação dos tecidos, adaptado de Kastrinaki *et al.*, 2009.

1.3-As Células do Sistema Imunológico

O nosso corpo dispõe de um importante sistema imunológico constituído por órgãos que exibem características específicas, como o tecido linfóide, uma grande variedade de células e múltiplos fatores solúveis. Todos estes componentes concorrem para uma resposta imunológica efetiva e bem organizada, que visa defender o organismo da agressão externa e preservar o seu equilíbrio funcional. O sistema imune é capaz de não só proteger o organismo contra invasores do exterior ou contra células internas alteradas mas é também fundamental para o equilíbrio homeostático do organismo (57,58).

As células do sistema imunitário são altamente específicas e cada tipo de célula exerce funções próprias. Derivam de precursores existentes na medula óssea e o processo

de formação de células sanguíneas a partir de células estaminais é designado por hematopoiese (Figura 9) (57,58).

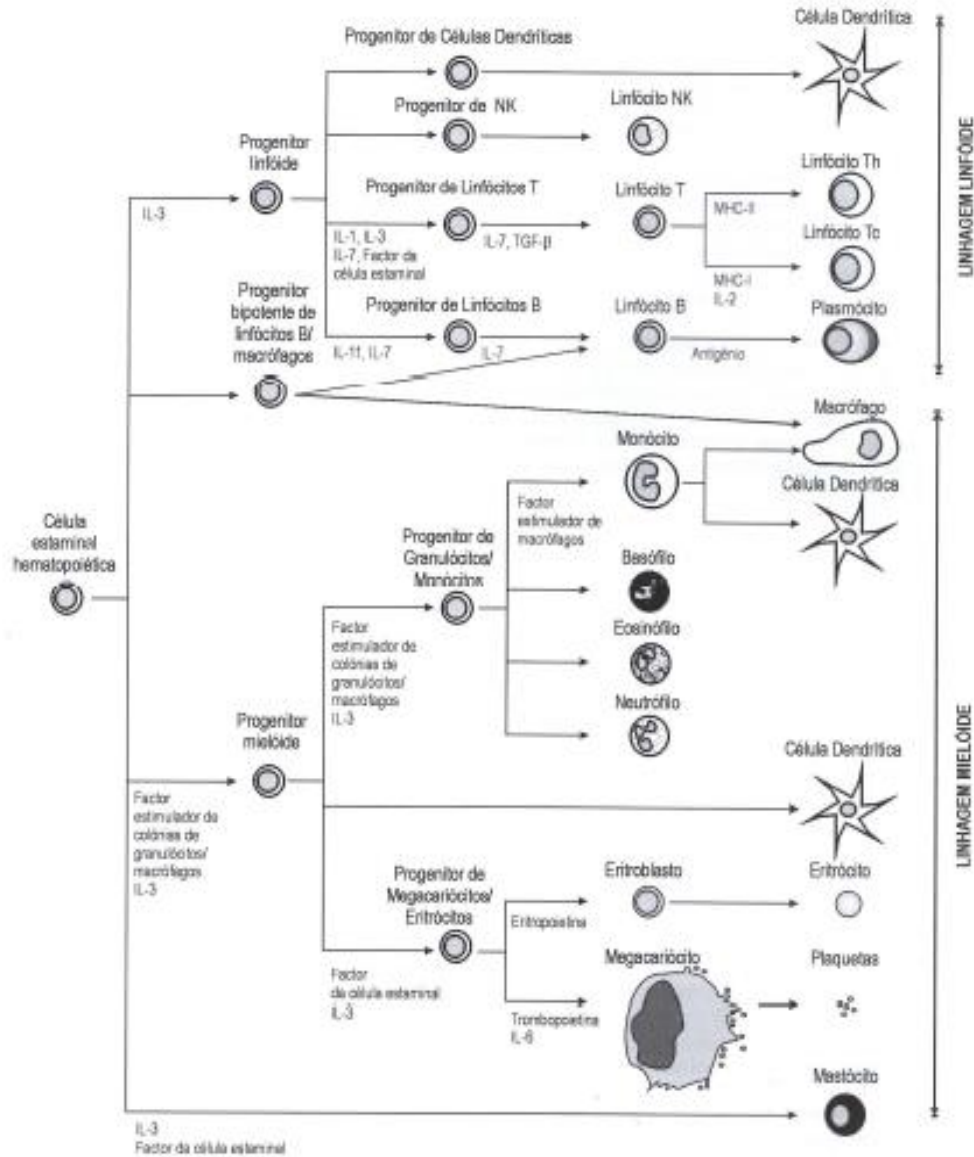


Figura nº9: Modelo da hematopoiese. Este esquema resume vários modelos descritos para a hematopoiese e estão indicados alguns fatores solúveis envolvidos neste processo e as vias de diferenciação das diferentes células sanguíneas mais conhecidas, adaptado da pag.21 de Arosa *et al.*, 2007.

A hematopoiese é o processo de formação, de desenvolvimento e de maturação dos elementos sanguíneos, a partir de um precursor celular comum e indiferenciado, conhecido como célula estaminal hematopoiética ou *stem-cell*. A célula estaminal tem a capacidade de

se dividir e se diferenciar em várias células, originando uma linhagem de células sanguíneas (linfóide ou mielóide). Distinguem-se dois tipos de leucócitos: os mononucleares ou agranulócitos (linfócitos e monócitos) e polimorfonucleares ou granulócitos que, de acordo com as características dos seus grânulos, podem dividir-se em três classes: basófilos, eosinófilos e neutrófilos. O progenitor linfóide origina os linfócitos T, B e NK e o progenitor mielóide, origina outros tipos de leucócitos, como os granulócitos, monócitos, eritrócitos e os megacariócitos (57,58).

1.3.1-Linfócitos

Os linfócitos têm um papel central no sistema imune, uma vez que conferem especificidade nas respostas imunológicas. Existem três grandes famílias de linfócitos: os B, os T e os NK.

Os linfócitos maturam nos órgãos linfóides primários e daí os linfócitos entram para a circulação sanguínea, da qual saem para os demais tecidos do corpo, sobretudo para os órgãos linfóides secundários. Estes órgãos proporcionam uma comunicação entre os linfócitos e as células apresentadoras de antígenos, diferenciando-se os linfócitos em células efetoras ou de memória. Existem três tipos principais de órgãos linfóides secundários: o baço, que recolhe os antígenos do sangue, os gânglios linfáticos, que recolhem os antígenos dos demais tecidos do organismo e os tecidos associados às mucosas, que recolhem os antígenos das superfícies epiteliais do organismo. Diferentes subpopulações de linfócitos ocupam diferentes órgãos, consoante as diferentes necessidades funcionais e particulares a cada tecido. Os linfócitos B têm origem na medula óssea e são responsáveis pela produção de anticorpos, tarefa principalmente atribuída aos plasmócitos. Os linfócitos T sofrem maturação no timo e são as principais células na imunidade celular, reconhecendo e interagindo com uma ampla variedade de antígenos específicos.

Um terceiro grupo de linfócitos, as células NK, são assim designados devido à sua capacidade espontânea de reconhecer e destruir células anormais, assim como produzir rapidamente fatores solúveis, como as citocinas com efeitos microbicidas ou de ativação doutras células do sistema imunológico (Tabela 2) (59,60).

Tabela 2: Citocinas e suas funções no processo inflamatório, adaptado de Roitt I, *et al.* Fundamentos de Imunologia, Editora Guanabara koogan 10ª edição 2004.

CITOCINA	FUNÇÃO EFECTORA
IL-1 α e IL-1 β	Co-estimulação na activação de células T, por aumentar a produção de citocinas Estimulação da proliferação e da maturação das células B Citotoxicidade de células NK Febre
IL-2	Indução da proliferação de células T e B activadas Estimulação da citotoxicidade das células NK Expansão clonal dos linfócitos Tc
IL-6	Diferenciação da linha mielóide, das células pluripotentes e das células B em células plasmáticas Proliferação das células T Resposta de fase aguda do fígado Febre
TNF- α	Libertação de prostaglandinas Activação de macrófagos Indução de moléculas de adesão ICAM-1 nas células endoteliais Activação de neutrófilos e da sua ligação ao endotélio Resposta da fase aguda do fígado Febre
TNF- β	Indução de genes inflamatórios e de genes envolvidos na neogénese do tecido linfóide Activação das células NK, e da sua actividade anti-tumoral
IFN- α e IFN- β	Activação de macrófagos Indução da citotoxicidade dos linfócitos NK
IFN γ	Inibição da replicação viral, activação e recrutamento de macrófagos

1.4-Células NK

1.4.1-Characterização das células NK

As células NK são definidas pela sua capacidade para matar células tumorais espontaneamente e células infetadas por vírus.. As células NK constituem a terceira maior população de linfócitos em conjunto com as células T e B. A maioria das células NK apresentam vida relativamente curta, embora subpopulações com maior durabilidade foram identificadas nos nódulos linfáticos e no timo. Há cerca de 2 bilhões de células NK em adultos e são encontradas principalmente no SP, MO, baço, fígado, gânglios linfáticos, timo, pulmão, peritoneu e no útero durante a gestação (12,26,31,41,55,61).

A maior parte dos autores concorda que os linfócitos T, B e células NK têm origem num precursor comum. A MO é considerada o sítio primário de geração das células NK

porque possui todos os substratos celulares e fatores solúveis necessários para a maturação destas células. Entretanto ainda não está claro se a MO sozinha é suficiente para garantir a maturação completa das células NK. Existe a possibilidade de que as células NK sejam geradas na MO e completem maturação noutra sítio. Foram encontrados precursores de células NK no fígado, baço e gânglios linfáticos, sustentando essa teoria (59,60).

As células NK constituem hoje uma população heterogênea e estão presentes na circulação sanguínea, onde representam entre 10-20% do total de células mononucleares em condições normais e que, após a ativação, podem migrar para uma variedade de tecidos e órgãos.

As células NK participam na desregulação imune em vários níveis, através da interação com outras células do sistema imune inato e adaptativo e através da produção de citocinas inflamatórias como por exemplo, o $\text{IFN}\gamma$, a IL-2 e o $\text{TNF}\alpha$. Contém grânulos citotóxicos no interior nos quais há enzimas, perforinas e granzimas que lisam as células alvo, aumentando a sua toxicidade (26,41,61).

Nos seres humanos, as células NK são fenotipicamente definidas como $\text{CD3}^- \text{CD56}^+$ e podem ser subdivididas em duas subpopulações fenotípica e funcionalmente distintas: as $\text{CD56}^{\text{dim}} \text{CD16}^+$, que representam 90% de todas as células NK e as $\text{CD16}^- \text{CD56}^{\text{bright}}$. No primeiro caso são eficientes em matar células alvo, com atividade essencialmente citotóxica. Os outros 10% de células NK possuem como principal função a secreção de citocinas, incluindo o $\text{IFN}\gamma$, o $\text{TNF}\alpha$ e o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF). Além disso, diferem quanto à expressão de recetores que regulam a sua atividade, de moléculas de adesão e de recetores de citocinas que facilitam a migração para os tecidos linfóides e para os locais da inflamação (16,26,42). As células NK não expressam o recetor da célula T para o antígeno (TCR) nem a molécula acessória CD3. A maioria das células NK expressa CD16, recetor para a porção Fc de IgG (26,41,61).

Vários estudos avaliam e associam o número, os fenótipos e as funções das células NK às doenças auto-imunes. No entanto, torna-se difícil determinar se estas alterações decorrem do processo inflamatório, de distúrbios imunológicos, da terapia utilizada ou se representam um defeito primário destas células (26,41,61).

1.4.2-Subpopulações de células NK

Como foi descrito atrás, foram identificados dois subtipos distintos de células NK. A subpopulação $CD56^{dim}CD16^+$ é a mais citotóxica, enquanto a $CD56^{bright}CD16^-$ é a responsável pela produção de citocinas. As principais características que diferenciam essas células estão representadas na Tabela 3. O significado funcional *in vivo* desses subtipos distintos de células NK e como eles podem interagir entre si ainda não estão completamente definidos (41).

Tabela 3: Principais diferenças fenotípicas e funcionais de células NK, adaptado da pag. 153 de Arosa *et al.*, 2007.

Caraterística	$CD56^{bright}$	$CD56^{dim}$
CD56	+++	+
CD16	+/-	+++
Citocinas	+++ (TNF β , TNF α , IFN γ , IL-10)	+
Recetores KIR	+	+++
Recetores para quimiocinas	CCR7	CXCR1, CX ₃ CR1
Moléculas de adesão	L-selectina	PEN5-PSGL-1

A subpopulação $CD56^{dim}$ é predominante no sangue periférico (cerca de 90%), tem a capacidade de exercer citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) por expressar CD16, responde a IL-2 levando a uma potencialização da sua função e têm maior concentração de grânulos no seu citoplasma (41).

As células $CD56^{bright}$ produzem citocinas imunorreguladoras, incluindo o TNF α e β , o IFN γ , o GM-CSF, a IL-10 e a IL-13. Esta subpopulação expressa o recetor de IL-2 de alta afinidade o que a torna capaz de sofrer expansão *in vitro* e *in vivo* em resposta a baixas concentrações de IL-2 apresentando pouca atividade citolítica. Embora a subpopulação $CD56^{bright}$ seja rara no SP ($\pm 10\%$ das células NK), ela representa a subpopulação predominante nos tecidos e gânglios linfáticos. Isto pode ser justificado pelo facto das células $CD56^{bright}$ expressarem moléculas de adesão e recetores de citocinas diferentes das $CD56^{dim}$. A subpopulação $CD56^{bright}$ expressa moléculas necessárias ao tráfego para os gânglios linfáticos periféricos através de veias do endotélio. Nos gânglios linfáticos, essas

células localizam-se na mesma região onde estão os linfócitos T e as CDs, o que é consistente com o seu papel imunorregulador da resposta adaptativa (41).

1.4.3-Funções

As duas principais funções das células NK são a citotoxicidade e a produção de citocinas. As células NK exibem maior citotoxicidade quando ativadas por citocinas, como a IL-2 ou a IL-15 (26).

O primeiro passo para a citotoxicidade mediada por células NK é a adesão. As integrinas e outras moléculas de adesão têm um papel crucial na interação entre a célula NK e a célula alvo. Uma das principais integrinas é o antigénio-1 associado à função linfocitária (LFA-1), que tem a função de induzir a polimerização de actina, rearranjos do citoesqueleto e aglomeração de vesículas lipídicas. Estes sinais sozinhos podem ser suficientes para ativar a citotoxicidade mediada por células NK. O processo de adesão à célula alvo induz alterações dinâmicas na morfologia das células NK e os grânulos líticos são orientados para o local de interação com a célula alvo. Esse movimento é realizado através de estruturas do citoesqueleto pelo centro de organização de microtúbulos. Em seguida, a membrana externa do grânulo funde-se com a membrana citoplasmática, libertando o seu conteúdo no espaço sináptico. Os principais conteúdos desses grânulos são moléculas de perforina e granzima (26).

As perforinas são proteínas que formam poros na membrana das células alvo, podendo alterar a permeabilidade e levar à lise osmótica. A perforina é armazenada em grânulos citoplasmáticos que são libertados após a ativação de células NK. Os monómeros de perforina são inseridos na membrana plasmática das células alvo e polimerizam num poro pelo qual a granzima A e B entra e induz a apoptose.

As granzimas são uma família de proteases serínicas. Em humanos, há cinco tipos de granzimas (A, B, H, K e M). A granzima B é considerada o membro pró-apoptótico mais importante dessa família (26).

As células NK produzem também o ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF (TRAIL) e o ligando do Fas (FasL também conhecido como CD95), que são mediadores importantes da apoptose. O TRAIL só é expresso por subpopulações de células NK em repouso, mas é geralmente produzido após estimulação pela IL-2, IFN α/β ou IL-15. O Fas é uma proteína transmembranar expressa por diferentes tipos de células e induz sinais apoptóticos após ligação ao FasL (41). Muitas células tumorais não expressam Fas,

mas as células NK podem diretamente induzir a expressão de Fas em células tumorais através da secreção de TNF α (26).

A citotoxicidade direta contra células tumorais ou infetadas por vírus é apenas um componente da resposta das células NK. Outro componente é a produção de citocinas libertadas por estas células, como o IFN γ , que inibe a angiogénese tumoral, estimula a imunidade adaptativa induzindo respostas Th1 e regula positivamente a expressão de MHC-I numa variedade de células, como as células apresentadoras de antígenios (APCs). As subpopulações de células NK podem também produzir TNF α , GM-CSF, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β . Tem sido descrito que algumas citocinas, incluindo a IL-2, a IL-12, a IL-15 e a IL-18 podem estimular a produção de citocinas em células NK (62,63).

1.4.4-Recetores das células NK

A atividade das células NK é regulada por um conjunto de recetores inibidores ou ativadores que reconhecem diferentes moléculas, principalmente, moléculas do MHC da classe I. A ativação das células NK depende do balanço da estimulação dos recetores ativadores e inibidores, quer para a lise de células alvo quer para a libertação de citocinas. Estão identificadas várias famílias de recetores de morte sendo os três principais: o da superfamília das imunoglobulinas (KIR) que reconhecem principalmente moléculas HLA-A, B e C, o da família das lectinas tipo-C que incluem os recetores CD94/NKG2, que reconhecem moléculas de MHC-I não clássicas (HLA-E) e moléculas MHC-I-like e o da família dos recetores de citotoxicidade natural (NCR), que inclui os recetores ativadores NKp30, NKp44 e NKp46, cujos ligandos não são ainda completamente conhecidos (Tabela 4) (26,40,41,64).

Tabela 4: Principais famílias de recetores de células NK, adaptado de Diamond *et al.*, 2008.

Família de receptores	Membros	Ligante(s)	Tipo de sinal
Semelhantes à lectina tipo C	CD94/NKG2A/B	HLA-E	inibidor
	CD94NKG2C	HLA-E	ativador
	CD94/NKG2E/H	Ainda não foram identificados	ativador
	NKG2D	MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 e ULBP3	ativador
Receptores de citotoxicidade natural (NCR)	NKp46	Ainda não foram identificados	ativador
	NKp44	Ainda não foram identificados	ativador
	NKp30	Ainda não foram identificados	ativador
Killer immunoglobulin-like receptors (KIR)	KIR2DL1	HLA-C do grupo 2 (Cw2, 4, 5, 6 e outros)	inibidor
	KIR2DL2	HLA-C do grupo 1 (Cw1, 3, 7, 8 e outros)	inibidor
	KIR2DL3	HLA-C do grupo 1	inibidor
	KIR2DL5	Ainda não foram identificados	inibidor
	KIR3DL1	HLA-Bw4	inibidor
	KIR3DL2	A3, A11 e outros ainda não identificados	inibidor
	KIR3DL3	Ainda não foram identificados	inibidor
	KIR2DS1	HLA-C do grupo 2	ativador
	KIR2DS2	HLA-C do grupo 1	ativador
	KIR2DS3	Ainda não foram identificados	ativador
	KIR2DL4	HLA-G	ativador
	KIR2DS4	Ainda não foram identificados	ativador
	KIR2DS5	Ainda não foram identificados	ativador
	KIR3DS1	Ainda não foram identificados	ativador

As duas subpopulações de NK também diferem quanto à expressão de recetores de ativação e inibição. As NK CD56^{dim} expressam níveis elevados de recetores KIR e níveis intermédios de CD94/NKG2A. As NK CD56^{bright} expressam níveis baixos ou mesmo nulos de recetores KIR e do recetor inibidor CD94/NKG2A níveis elevados. Por outro lado, os recetores ativadores NCR NKp30 e NKp46 parecem ter expressão idêntica nos dois subtipos de células NKs.

Também se verificam diferenças significativas na expressão de moléculas de adesão celular e recetores de citocinas entre os dois subtipos de células NK. As células NK CD56^{bright} exibem níveis elevados da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e do recetor de citocina CCR7, contrariamente às CD56^{dim}. Em relação a outros recetores de citocinas, os estudos realizados são discrepantes em relação à distribuição pelos dois subtipos de células. Segundo Campbell *et al.* o subtipo NK CD56^{bright} expressa níveis elevados de CCR5, CXCR3 e CXCR4 e níveis baixos ou ausência de expressão de outros, como o

CXCR1, CXCR3, CCR1-4, CCR6 e o CCR9. Por sua vez, as células NK CD56^{dim} expressam níveis elevados de CXCR1, CXCR3 e CXCR4 e níveis intermédios de CXCR2 e CXCR5, não expressando CCR1-7, CCR9 e CXCR5. Assim, a expressão de CXCR1, CXCR2 e CXCR3 parece ser mais característica das NK CD56^{dim}, enquanto as NK CD56^{bright} expressam CCR7, CCR5 e CXCR3, com expressão semelhante de CXCR4 em ambas as populações. Como consequência da atividade diferente de recetores de citocinas, os dois subtipos têm propriedades migratórias distintas. Ambos migram para locais com inflamação, mas, por exemplo, o CCR5 promove a migração das células NK CD56^{bright} para fluídos sinoviais inflamados (nomeadamente na artrite reumatóide) e a expressão do CXCR1 permite a migração e acumulação de células NK CD56^{dim} no fígado de doentes com cirrose biliar primária (26,40,41,64).

1.4.5-Células NK na AR

O papel das células NK na AR não está claramente explicado. Dalbeth e Callan afirmam que a subpopulação de células NK CD56^{bright} se encontra expandida dentro das articulações afetadas, e que aí produzem IFN γ . Além disso, estas células podem induzir a diferenciação de monócitos em CDs (26,41).

Estudos dos fatores de risco genéticos predisponentes para a AR apontam que os genes que codificam os recetores das células NK são preliminares. Parece existir evidências que os KIR estão implicados em doenças auto-imunes. Yen *et al.* descobriram que os pacientes com AR têm uma expansão da população original de células T CD4⁺CD28⁻ o que é incomum em indivíduos saudáveis. Esta população celular está potencialmente envolvida no dano endotelial. As células T CD4⁺CD28⁻ são funcionalmente distintas a partir das células Th CD4⁺ e partilham algumas características com as células NK. Por exemplo, não expressam CD40 ligando, mas expressam CD57 e produzem grandes quantidades de IFN γ , granzima B e perforina (26).

Uma das mais potentes citocinas osteoclastogénicas e que é fundamental na patogénese da AR é o TNF α . Embora sejam os macrófagos e os monócitos a produzir a maior parte do TNF α na AR, as células T são também abundantes na sinóvia e tanto as T CD4⁺ como as T CD8⁺ podem produzir grandes quantidades de TNF α e de TNF β (26,41,64).

As células NK compreendem uma fração significativa dos linfócitos (8 a 25%) no

fluido sinovial de pacientes com AR e podem ser detetadas no início ou no curso da doença. A maioria das células NK no fluido sinovial de pacientes com AR são CD56^{bright} com expressão elevada de CD94/NKG2A e baixa expressão de KIRs. As células NK CD56^{bright} expressam marcadores de ativação, como o CD69 e produzem citocinas, como o TNF α e o IFN γ , contribuindo desta forma para a *pool* de TNF α (26). As células NK podem produzir IL-22, uma citocina que induz a proliferação de fibroblastos sinoviais, bem como, amplificar os efeitos do TNF α , IFN γ e IL-17. As células NK podem também produzir outros mediadores inflamatórios, como a IL-1, o TNF α , a IL-6 e a IL-8, que são responsáveis pela infiltração das células inflamatórias, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Por outro lado, a IL-1 ativa células sinoviais e osteoclastos a produzir MMPs e collagenases causando a destruição do osso e da cartilagem (26,40).

A IL-15 é uma das principais causadoras da patogênese de AR, em conjunto com outras citocinas, como o TNF α , a IL-6 e a IL-18. A IL-6 tem um grande papel na inflamação reumatóide, podendo atuar sinergicamente com a IL-15 para aumentar a atividade citotóxica das células NK. Os níveis de IL-15 aumentam com a duração da doença (26,41).

Outras alterações fenotípicas e funcionais das células NK na AR têm sido descritas na literatura, como a diminuição da expressão dos recetores NKG2D, CD16 e CD244 (26,40,41).

Desta forma, vários estudos têm sugerido que as células NK, através da produção de citocinas inflamatórias e através da sua capacidade citotóxica, podem desempenhar um papel patogénico na AR.

1.5-Objetivos

O presente estudo teve como objetivo analisar a ação imunomoduladora das células mesenquimais do estroma da medula óssea em células NK do sangue periférico em pacientes com AR e comparar com os resultados obtidos nas mesmas células de indivíduos saudáveis, contribuindo para um melhor conhecimento da função imunomoduladora das MSCs e a sua utilização terapêutica nesta doença auto-imune.

Para este efeito procedeu-se a:

- Co-culturas com MNC e MSCs, com posterior ativação *in vitro* com Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e Ionomicina e determinação da frequência de células NK a produzir TNF α ou IFN γ , bem como, a expressão destas duas proteínas por citometria de fluxo.

2-Material e Métodos

2.1-Material

O grupo de pacientes foi composto por doze pacientes diagnosticados com AR (68,5% femininos, com idade média $52,6\pm 9,3$) de acordo com os critérios do ACR/EULAR para AR, seguido no Departamento de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra e que aceitaram fazer parte do estudo. Pacientes com infeções ativas, amiloidose secundária, sob tratamento biológicos e que não aceitaram o consentimento informado para participar foram excluídos. No momento da colheita de sangue, os pacientes foram avaliados por um reumatologista com experiência na evolução de pacientes com AR. Dados referentes ao número de articulações inchadas, articulações dolorosas, VS e PCR foram registados e a atividade da doença através do DAS28 calculada. Dados sobre a terapia atual, FR, anticorpo anti-CCP, erosões radiográficas e duração da doença foram registados na revisão de prontuários (Tabela 5).

O grupo controlo foi composto por oito indivíduos saudáveis, com uma média de idades $40,9\pm 10,56$ anos e 87,5% do sexo feminino. Foi necessário um completo e breve questionário sobre as condições médicas anteriores ou atuais e medicação. Todos são livres de doenças auto-imunes, processos inflamatórios e infeção ativa e não foram submetidos a tratamentos com drogas imunomoduladoras. Todo o consentimento informado fornecido foi assinado.

O estudo respeita o princípio da Declaração de Helsínquia de 1975, revista em 2008 e todos os participantes deram e assinaram o consentimento informado.

Tabela 5: Caracterização da população em estudo

	Controlos saudáveis (n=8)	Doentes AR (n=12)
Feminino (%)	87,5	68,5
Média (média \pm SD)	40,9 \pm 10,56	52,6 \pm 9,3
FR (%)	--	100
Anti-CCP (%)	---	100
TJC	--	2,4 \pm 1,9
SJC	--	4,3 \pm 2,5
VS	--	25,8 \pm 14
PCR	--	1,4 \pm 1,3
DAS	--	3,25 \pm 0,8
Metotrexato % Dose média (mg/wk)	--	82,8 15,6 \pm 9,1
Prednisolona % Dose média (mg/dia)	--	85,7 4,1 \pm 1,7
Hidroxicloroquina % Dose média (mg/dia)	--	44,3 177 \pm 207,1
Salazopirina % Dose média (mg/dia)	--	51,4 1228,5 \pm 1292,6

2.2-Procedimentos

2.2.1-Amostras Biológicas

Por cada participante foram colhidos 20 ml de sangue periférico, em tubos de heparina-lítio. As amostras foram enviadas para o laboratório e identificadas com um número de código, sendo realizada tendo em atenção o estado da doença do participante.

2.2.2-Purificação e co-cultura com células mononucleares (MNC) do sangue periférico e isolamento de MSCs

As co-culturas foram realizadas por cada participante em placas de cultura de tecidos com células mononucleares do sangue periférico (MNC) de controlos ou doentes e MSCs humanas da MO, na presença de PMA (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e ionomicina (Boehringer Mannheim, Gernany). A PMA é também vulgarmente utilizada em conjunto com ionomicina para estimular a ativação de células T, proliferação e produção de citocinas, e é utilizada em protocolos de coloração intracelular. Já a ionomicina é um ionóforo produzido pela bactéria *Streptomyces conglobatus*.

Inicialmente foram preparadas as MNC a partir de sangue periférico heparinizado. O procedimento usado foi a separação das células mononucleares em gradiente de densidade. Seguiram-se os seguintes passos: 1. Adicionou-se soro fisiológico (diluição 1:2) a cada tubo de Falcon de sangue (Beckon Dickinson Bioscience (BD), San Jose, USA); 2. Colocou-se 2,5 ml de lymphoprep (Stem cell Technologies, Vancouver, Canadá) em frascos de vidro de 20 ml e adicionou-se, lentamente, sobre este (de maneira a evitar a mistura dos dois líquidos), 5 ml de sangue diluído; 3. Centrifugou-se durante 20 minutos a 2500 rpm, a 18°C (centrífuga 21AY01); 4. Recolheu-se o anel das células mononucleares situado entre o Ficoll e o plasma, rodando à volta do anel com uma pipeta Pasteur, para um tubo Falcon de 50 ml; 5. Adicionou-se à suspensão celular HBSS 1x (Hank's Balanced Salt Solution) até perfazer o volume final de 45 ml; 6. Centrifugou-se os tubos durante 15 minutos a 1500 rpm, a 18°C; 7. Decantou-se o sobrenadante para um balão de vidro e após agitação no vórtex, ressuspendeu-se o *pellet* celular em 45 ml de HBSS 1x; 8. Centrifugou-se durante 10 minutos a 1500 rpm e a 18°C; 9. Decantou-se o sobrenadante para um balão de vidro e após agitação no vórtex, ressuspendeu-se o *pellet* celular em 45 ml de HBSS 1x; 10. Centrifugou-se os tubos durante 10 minutos a 1500 rpm e a 18°C, de modo a eliminar as plaquetas do conteúdo celular; 11. Decantou-se o sobrenadante para um balão de vidro, adicionando ao *pellet* celular 1 ml de RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) e agitar no vórtex; 12. Efetuou-se uma diluição a 1:2 da suspensão celular, colocando num quadrado de parafilm 10µl desta e 10µl de azul de tripan; 13. Retirou-se 10µl da diluição efetuada no ponto 12 e encheu-se um dos dois retículos da câmara de Neubauer, para se visualizar a viabilidade celular. Registaram-se, no contador manual de células, as células vivas e mortas (coradas

de azul) encontradas nos quadrados do retículo dos glóbulos brancos. A viabilidade celular terá de ser sempre superior a 80%.

O procedimento para as MSCs seguiu os seguintes passos: 1. Centrifugou-se a 1100 rpm durante 5 minutos; 2. Decantou-se deixando só o sedimento; 3. Colocou-se 1 ml de RPMI.

As culturas consistiram em MNC do SP suplementadas com 10% de soro fetal de bovino com estimulação com PMA e Ionomicina, na ausência ou presença de MSCs. Com essa estratégia, duas co-culturas foram geradas: MNC+PMA+Ionomicina e MNC+PMA+Ionomicina+MSCs. Foram também usadas duas citocinas o TNF α e IFN γ . Um total de 500 μ l MNC foram adicionados em placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça) sendo as células ativadas com 100 μ l de PMA e ionomicina e na condição em que foram usadas MSCs adicionou-se 500 μ l, suplementado com 100 μ l de soro bovino fetal. Estas placas foram mantidas em cultura durante 24 horas a 37°C, em 5% de CO₂ e 90% de humidade. Depois de 24 horas sob cada condição, as células de cultura foram lavadas com PBS 1x, pH 7,4 (Gibco) e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. De seguida, foi adicionada Brefeldina A (Golgi plug- Sigma. Saint Louis, MO, USA) para ativação de linfócitos e incubou durante 4 horas. Depois da incubação foi feita marcação intracitoplasmática.

2.3-Identificação e quantificação de linfócitos NK

A fim de identificar os linfócitos foi feita marcação intracitoplasmática. Este procedimento seguiu os seguintes passos: 1-centrifugaram-se os tubos de citómetro e tirou-se o sobrenadante de cada tubo; 2-marcaram-se com os anticorpos (exceto o TNF α e IFN γ) descritos mais à frente; 3-incubaram durante 10 minutos no escuro; 4-adicionou-se 2 ml de lisante e centrifugou-se (1500 rpm durante 5 minutos); 5-aspirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ l do reagente 1 (fixante do Kit IntraprepTM (Beckman Coulter, Brea, EUA)); 6-incubou-se no escuro durante 10 minutos; 7-colocou-se 2ml de PBS 1x (Gibco) e centrifugou-se durante 5 minutos a 1500rpm; 8-aspirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ l do reagente 2 (permeabilizante Kit IntraprepTM); 9-incubou-se durante 10 minutos no escuro e adicionou-se os anticorpos monoclonais TNF α ou IFN γ ; 10-incubou-se 10 minutos. Seguiu-se a lavagem com 2ml PBS e foi centrifugado durante 5 minutos a 1500rpm e 11-por fim, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250 μ l de PBS e passou-se os tubos no citómetro.

Os anticorpos monoclonais (mAb) usados foram os seguintes: CD3 Pacific Blue (clone UCHT1. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA), CD8 Aloficocianina Helite 7 (clone SK1. BD, San José, CA, EUA), CD4 Ficoeritrina cianina 7 (clone SFCE12T4D11. Beckman Coulter, Brea, EUA), CD27 Ficoeritrina cianina 5 (clone 14CD27. BC, Brea, EUA), CD45Ra Aloficocianina (clone HI100. BD, San José, EUA), TNF α Isotiocianato de Fluoresceína (clone MP6-XT22. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e IFN γ Isotiocianato de Fluoresceína (clone 4S.B3. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA). Simplificando, foram utilizadas para identificar linfócitos: CD3 PB, CD4 PC7, CD8 APC H7, CD27 PC5, CD45Ra APC, TNF α /IFN γ FITC, sendo que as células NK são CD3 $^-$ e CD45Ra $^+$, expressando as duas citocinas, TNF α e IFN γ .

2.4-Citometria

As células foram adquiridas no Citómetro de fluxo FACS CantoTM II (BD) com *Software* FACSDiva 6.1.2 (BD) e foram analisados 100.000 eventos usando o *Software* Infinicyt 1.5 (Cytognos, Salamanca, Espanha).

2.5-Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software estatístico GraphPad Prism 6 para Windows. Os valores obtidos são apresentados em média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste Wilcoxon para amostras emparelhadas e correlacionados através do coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando se assumiu um erro aleatório (p) inferior ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$), com um nível de confiança a partir de 95%.

Para calcular a percentagem de inibição para a percentagem de células NK a produzir citocinas em estudo, bem como da expressão das mesmas foi usada a seguinte equação: $100 - [(MSCs/MNC) * 100]$.

3-Resultados

Para melhor compreensão dos efeitos reguladores das MSCs sobre as células NK, foram realizadas co-culturas com MNC estimuladas com PMA e ionomicina, com ou sem adição de MSCs.

De seguida, são apresentados os resultados obtidos, onde se pode observar a frequência de células NK produtoras de citocinas, como TNF α e IFN γ com a respetiva percentagem de inibição e a expressão relativa de cada uma, dada pela média de intensidade de fluorescência, nos grupos em estudo: controlos e doentes.

3.1-Frequência de células NK a produzir TNF α com e sem contacto com MSCs-MO e expressão desta proteína por célula

Na presença de MSCs observou-se em ambos os grupos em estudo uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de células NK a produzir TNF α , bem como, na expressão desta proteína por célula, dada pela média de intensidade de fluorescência, embora não ocorram diferenças entre os dois grupos (Figura 10 e 11).

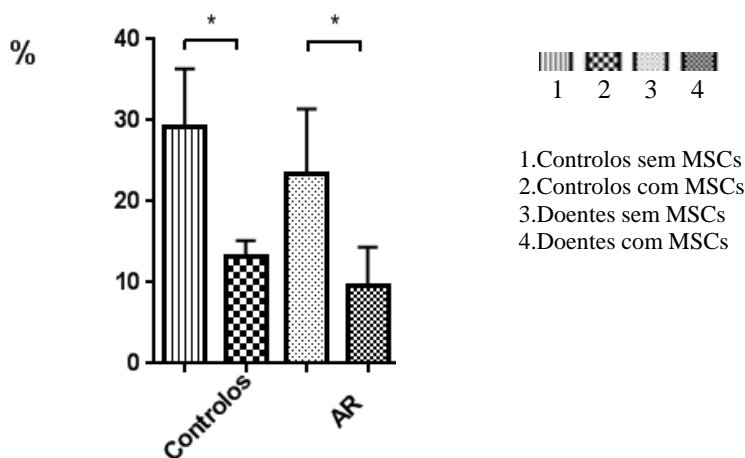


Figura nº10: Representação gráfica da frequência de células NK, produtoras de TNF α , após estimulação com PMA e Ionomicina com e sem contacto com MSCs, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR. *)Sem MSCs *versus* Com MSCs, $p < 0,05$.

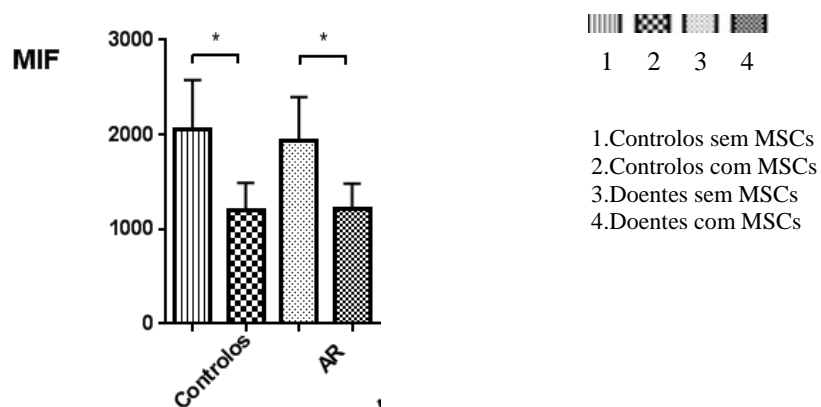


Figura nº11: Representação gráfica da expressão de TNF α , dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) nas células NK em ambos os grupos em estudo, com e sem contacto com MSCs. *)Sem MSCs *versus* Com MSCs, $p < 0,05$.

3.2-Frequência de células NK a produzir IFN γ com e sem contacto com MSCs-MO e expressão desta proteína por célula

Nas culturas celulares sem a presença de MSCs-MO observou-se no grupo controlo um aumento da frequência de células NK a produzir IFN γ quando comparado com o grupo de doentes com AR, embora sem significado estatístico. No entanto, a expressão desta citocina por célula, nas mesmas condições de cultura, encontra-se aumentada no grupo de doentes.

Na presença de MSCs observou-se em ambos os grupos em estudo uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de células NK a produzir IFN γ , bem como, na expressão desta proteína por célula, dada pela média de intensidade de fluorescência, embora não ocorram diferenças entre os dois grupos (Figura 12 e 13).

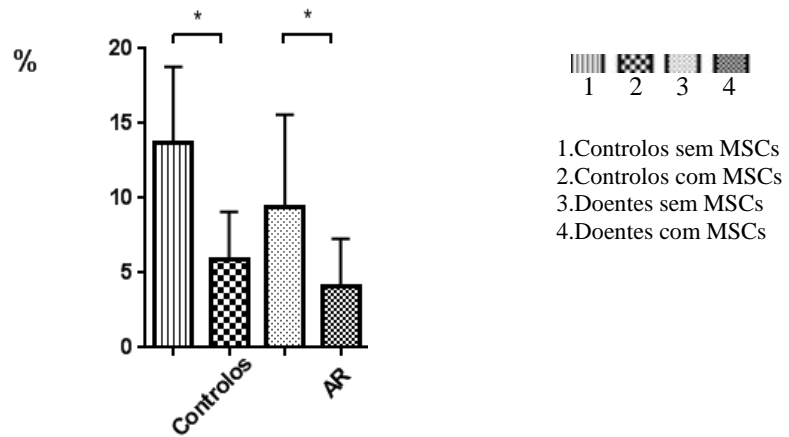


Figura nº12: Representação gráfica da frequência de células NK, produtoras de IFN γ , após estimulação com PMA e Ionomicina com e sem contacto com MSCs, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR. *)Sem MSCs *versus* Com MSCs, $p < 0,05$.

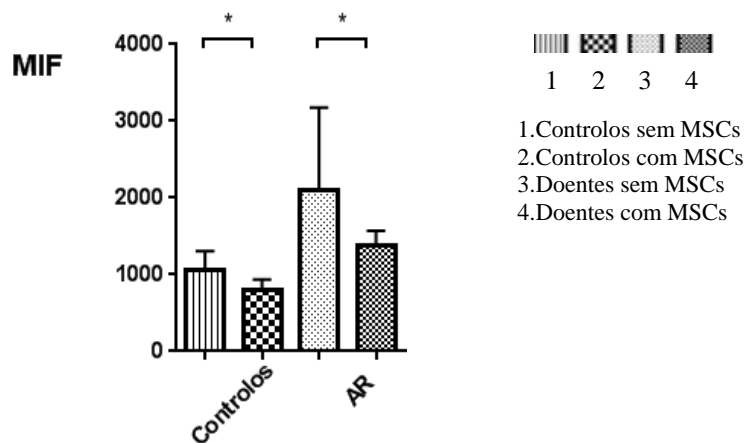


Figura nº13: Representação gráfica da expressão de IFN γ , dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) nas células NK em ambos os grupos em estudo com e sem contacto com MSCs. *)Sem MSCs *versus* Com MSCs, $p < 0,05$.

3.3-Comparação da percentagem de inibição para a percentagem de células NK a produzir citocinas em estudo, bem como da expressão das mesmas

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na percentagem de inibição induzida pelas MSCs na frequência de células NK a produzir $TNF\alpha$ ou $IFN\gamma$, bem como, na expressão destas proteínas por célula, entre os grupos em estudo e entre ambas as citocinas (Figura 14 e 15).

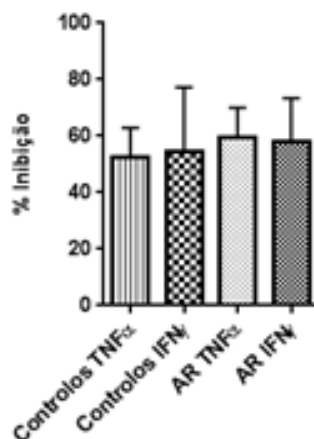


Figura nº14: Representação gráfica dos resultados da percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de $IFN\gamma$ ou $TNF\alpha$.

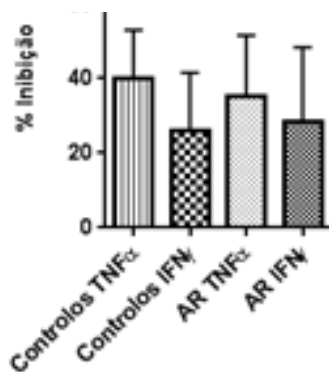


Figura nº15: Representação gráfica dos resultados da percentagem de inibição relativa à MIF de $IFN\gamma$ ou $TNF\alpha$ nas células NK.

3.4-Correlação entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de TNF α ou IFN γ e o índice DAS

Não se observou uma correlação entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK a produzir TNF α ou IFN γ e o índice DAS (Figura 16 e 17).

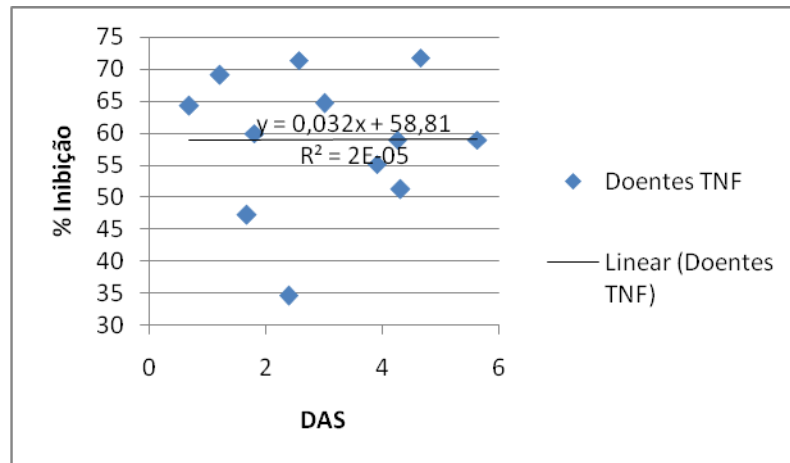


Figura nº16: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de TNF α e o índice DAS.

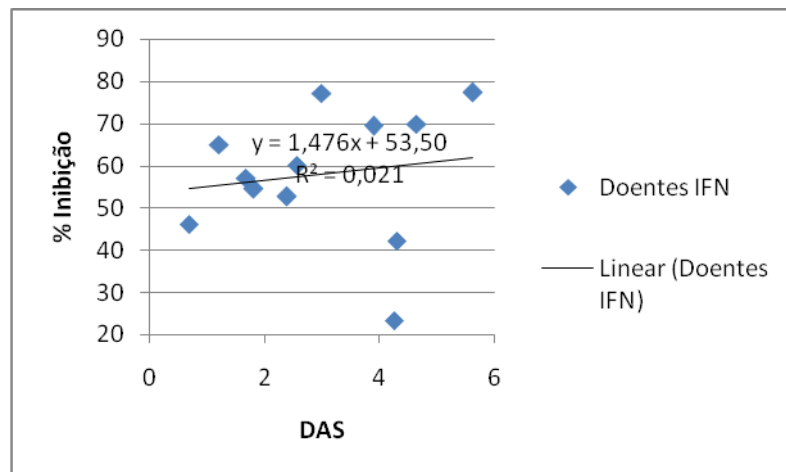


Figura nº17: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de IFN γ e o índice DAS.

3.5-Correlação entre a percentagem de inibição relativa à expressão das citocinas TNF α ou IFN γ nas células NK e o índice DAS

Observou-se uma correlação negativa entre a percentagem de inibição relativa à expressão de TNF α ou IFN γ nas células NK e o índice DAS (Figura 18 e 19). A expressão de ambas as citocinas (dada pela MIF), e que se correlaciona com a quantidade de citocina produzida por célula, diminui quando aumenta o valor de DAS.

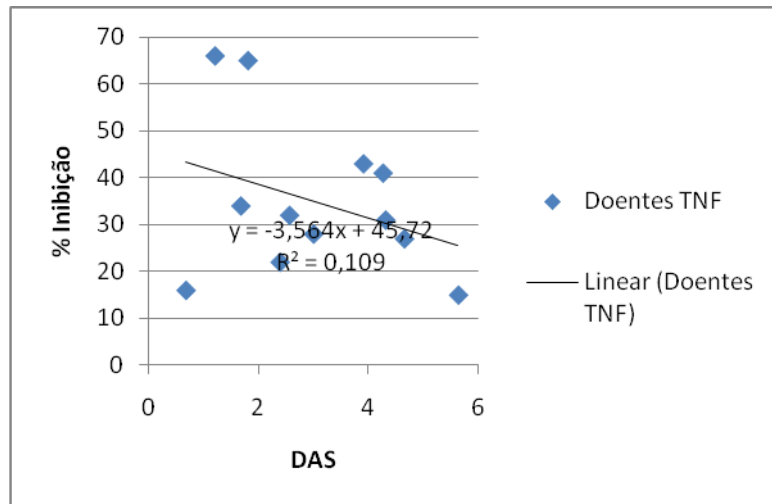


Figura nº18: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à expressão de TNF α nas células NK e o índice DAS.

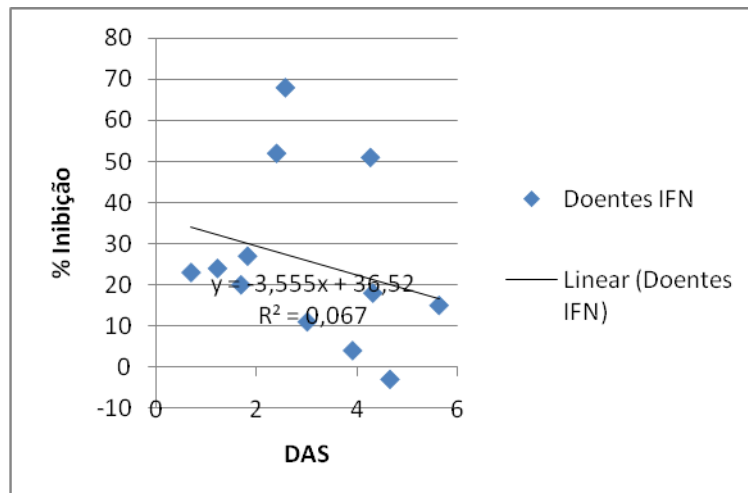


Figura nº19: Correlação de Pearson entre a percentagem de inibição relativa à expressão de IFN γ nas células NK e o índice DAS.

4-Discussão

Apesar do aumento significativo do número de ensaios clínicos que utilizam as MSCs, ainda existe a necessidade de esclarecer completamente de que forma elas atuam, quer ao nível da medicina regenerativa quer na capacidade que têm de regular respostas imunológicas ativas e refratárias na terapêutica convencional. Segundo Carine Bouffi *et al.* o papel das MSCs na artrite ainda precisa ser aprofundado antes de uma aplicação clínica sustentada poder ser iniciada. No entanto, já se sabe que as MSCs desempenham uma função benéfica devido às suas propriedades imunossupressoras e ao seu potencial de diferenciação para condrócitos. A engenharia baseada em MSCs é uma abordagem promissora em caso de lesão da cartilagem para contornar os tratamentos atuais, que raramente restaura as funções completas do tecido. As MSCs exercem o seu efeito imunossupressor após serem ativadas por citocinas pró-inflamatórias, tais como o $IFN\gamma$ e a $IL-1\beta$, secretados nas articulações artríticas. De facto, a inflamação local pode ser importante para as MSCs exibirem a sua eficácia terapêutica em AR. Um passo *in vitro* de pré-condicionamento das MSCs também pode ser necessário para acionar de forma mais eficiente o seu potencial imunomodulador (43).

Neste estudo fomos avaliar a ação das MSCs-MO na capacidade que as células NK possuem de produzir citocinas pró-inflamatórias, como o $TNF\alpha$ e o $IFN\gamma$, após ativação *in vitro* com PMA e Ionomicina, em doentes com AR e em pessoas saudáveis. Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que as MSCs-MO diminuem a frequência de células NK a produzir ambas as citocinas, o mesmo se passando para a quantidade de citocinas por célula. Esta inibição é idêntica para ambas as citocinas e para ambos os grupos em estudo, o que revela que as MSCs-MO inibem de forma eficiente as células NK do sangue periférico de doentes com AR.

Correlacionando o valor do DAS e a percentagem de inibição relativa à frequência de células NK produtoras de $TNF\alpha$ ou de $IFN\gamma$ não se observou qualquer tipo de correlação; no entanto, comparando os valores do DAS e a percentagem de inibição relativa à expressão de ambas as citocinas nas células NK observaram-se correlações negativas com o índice DAS. Pela análise destes resultados verificou-se que quanto maior o valor do índice DAS, menor a percentagem de inibição relativa da expressão das duas citocinas.

No desenvolvimento da artrite reumatóide ocorre efusão, devido ao aumento do fluxo sanguíneo e a alterações ao nível vascular, surgindo inflamação por intermédio de

importantes mediadores solúveis, como as citocinas, nomeadamente a IL-1, IL-6, TNF α e outros secundários como a PGE₂, radicais livres, substância P e óxido nítrico.

Acredita-se que as células NK desempenham um papel crítico na resposta inflamatória na AR (41,49). A contribuição das células NK para a artrite tem sido pouco clara, em parte devido às diversas funções deste subconjunto de linfócitos. Segundo Leslie A Fogel *et al.* os estudos de associação genética implicam as células NK na patogénese de várias doenças auto-imunes humanas. Estudos em AR afirmam que as células NK, tanto na periferia como nos tecidos afetados, são importantes para o início e progressão da auto-imunidade. As associações encontradas em seres humanos e as evidências empíricas de modelos em ratos demonstram que mais pesquisas sobre o papel das células NK em auto-imunidade se justifica e é suscetível de proporcionar novas perceções sobre a patogénese de doenças auto-imunes e conduzir a novos alvos terapêuticos nestas doenças (41).

A excessiva produção de citocinas nas articulações de pacientes com AR através da interação entre as células do sistema imune inato e adaptativo contribui para a progressão da doença, caracterizada pela inflamação crónica com consequente destruição da cartilagem, das articulações e dos ossos. Ocorre uma redução no número de células NK no SP de pacientes com AR, no entanto, não está claro se as alterações no número de células NK são uma consequência da inflamação em curso ou uma causa subjacente à auto-imunidade. Uma das citocinas essenciais para a patogénese da AR é o TNF α , claramente demonstrado pelo sucesso do tratamento com terapias anti-TNF α . Tem sido demonstrado que o fator nuclear Kappa-B, um importante regulador do crescimento e da diferenciação das células NK, pode ser ativado na presença de TNF α e de IL-15, desencadeando vias de sinalização inflamatórias, causando danos na matriz extracelular e destruição da cartilagem adjacente. As células NK fornecem, também, co-estimulação às células B e T através da expressão de moléculas como o CD40L, OX40, CD70 e CD86, contribuindo para a patogénese da AR. Além disso, estas células interagem com fibroblastos estimulando a produção de IFN γ pelos sinoviócitos (65).

Mediante um contato direto das MSCs com o tecido ou mediante a interação parácrina com o IFN γ , produzido por células imunes do organismo, as MSCs desencadeiam a libertação de diversos fatores solúveis que atuam sobre as células do sistema imunológico. Os fatores solúveis envolvidos na imunomodulação por parte das MSCs, e bem descritos na literatura, são a PGE₂, a IL-4, a IL-6, a IL-10, o TGF- β , o HGF e

a enzima IDO (62,66). O TGF- β e o HGF suprimem a proliferação dos linfócitos T e B, já a libertação de PGE₂ inibe, especificamente, a produção dos linfócitos T citotóxicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A enzima IDO pode levar à supressão da proliferação celular, principalmente das células T efetoras, produzindo por esta via efeitos imunomodulatórios. *In vitro*, a IDO, a PGE₂ e o TGF- β induzem a perda do potencial citotóxico das células NK, por suprimirem a produção de IL-2, de IL-15 e de IFN γ (67,68). As MSCs podem, por mecanismos ainda não elucidados, inibir a indução da proliferação em células NK não ativadas (69,70).

Estudos indicam que as MSCs-MO humanas reduzem fortemente a inflamação articular e sistémica com uma eficácia similar ou até maior do que a de algumas drogas imunossupressoras clássicas. A redução de citocinas observada pode explicar, em parte, a ausência de infiltrados inflamatórios na membrana sinovial. Além disso, o tratamento com MSCs-MO humanas regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IFN γ , IL-6, IL-17, IL-1 β e IL-12 por células imunitárias sinoviais (68,69).

No entanto, é importante salientar que as células NK, previamente ativadas pela IL-2, lisam de maneira eficiente as MSCs (Spaggiari *et al*). Este efeito pode ser inibido pela exposição das MSCs ao IFN γ , o que resulta numa maior expressão das moléculas de HLA classe I na superfície das MSCs (70).

De uma maneira geral, as MSCs provocam a inibição das células NK, quer ao nível da proliferação celular, quer ao nível da sua capacidade citotóxica, quer inibindo a libertação de IFN γ por estas células.

A necessidade de uma terapia mais eficaz no tratamento das doenças auto-imunes, nomeadamente da AR, faz com que exista um número crescente de estudos de investigação fundamental, promovendo um maior conhecimento da biologia das MSCs, bem como, de estudos translacionais associados a ensaios clínicos, segundo Faye H Chen *et al*. O conhecimento da identificação/caracterização das MSCs, o seu isolamento, expansão e diferenciação em diferentes linhas germinativas ainda requer mais investigação (13,71).

Os resultados apresentados envolvem um número limitado de indivíduos, e, por isso, as conclusões devem ser consideradas com prudência, no entanto, estes sugerem que terapias celulares com base em MSCs poderão constituir uma modalidade terapêutica passível de induzir melhoria das condições de vida de doentes com AR.

5-Conclusão

Atualmente as MSCs representam uma estratégia promissora e alternativa no tratamento de várias doenças auto-imunes, nomeadamente na AR, podendo apresentar nesta, um duplo papel. As MSCs podem, por um lado, contribuir para a reparação da cartilagem e do osso, e por outro, e fruto das suas capacidades imunoreguladoras, inibir diferentes células do sistema imune, como as células B, T, células apresentadoras de antígeno e células NK. Este estudo centrou-se nestas últimas e mostrou claramente que as MSCs-MO inibem de forma eficiente a capacidade de produção de citocinas, nomeadamente TNF α e IFN γ pelas células NK, quer provenientes de indivíduos saudáveis quer de doentes com AR, podendo desta forma contribuir para uma diminuição da inflamação e dos sintomas na AR, se utilizadas como terapia celular.

6-Referências Bibliográficas

1. Ghosh AK. Mayo Clinic Internal Medicine Review. Mayo Clin. Sci. Press. 8th ed. 2008. p.971–1030.
2. Lipsky PE, Isselbacher KJ, Braunwald E, Fauci AS et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. Rheum. arthritis. 2008;17th ed:2083–90.
3. Firestein GS, Budd RC, Harris ED, McInnes IB, Ruddy S SJ. KELLEY'S Textbook of Rheumatology. 8th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company;2008.
4. Cascão R, Moura R a, Perpétuo I, Canhão H, Vieira-Sousa E, Mourão AF, et al. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. BioMed Central Ltd. 2010 Jan;12(5):196.
5. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. Arthritis Research Therapy 2009 Jan;11(3):229.
6. Ferreira LN, Ferreira PL BR. Qualidade de Vida em Doentes com Artrite Reumatóide. Acta Reum. Port. 2008;33:331–42.
7. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. Arthritis Rheumatism. 2010 Jun;62(6):1576–82.
8. Teixeira RCDA, Júnior AG, Martino MC De. Marcadores de Ativação Endotelial e Auto-Anticorpos na Artrite Reumatóide. Rev. Bras. Reumatol. 2007;411–7.
9. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Ann 27. 2001;269–81.
10. Ferreira A, Matos AN, Maria Á, Lima S, Fernandes E. Valor Diagnóstico do Anticorpo Antipeptídeo Citrulinado Cíclico na Artrite Reumatóide. Rev. Bras. reumatol. 2006;(98):174–80.
11. Lee HK, Lim SH, Chung IS, Park Y, Park MJ, Kim JY, et al. Preclinical efficacy and mechanisms of mesenchymal stem cells in animal models of autoimmune diseases. Immune Netw. 2014 May;14(2):81–8.
12. Walsh CE, Ryan EJ, O'Farrelly C, Golden-Mason L, FitzGerald O, Veale DJ, et al. Differential expression of NK receptors CD94 and NKG2A by T cells in rheumatoid arthritis patients in remission compared to active disease. PLoS One. 2011 Jan;6(11):27182.
13. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. Arthritis Res. Ther.2008 Jan;10(5):223.

14. Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J. Transl. Med.* 2014 Jan;12(1):157.
15. Mitchell KL PD. Early rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;19(3):278–83.
16. Smoleńska Ż, Pawłowska J, Daca A, Soroczyńska-Cybula M, Witkowski J, Bryl EM. Disease activity in patients with long-lasting rheumatoid arthritis is associated with changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2012 Jan;122(12):591–8.
17. Shattuck F. Considerações sobre o Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e a avaliação inicial da artrite reumatóide. *Rev. Bras. Reumatol.* 2011;50(5):199–219.
18. Tedesco A, D'Agostino D, Soriente I, Amato P, Piccoli R SP. A new strategy for the early diagnosis of rheumatoid arthritis: a combined approach. *Autoimmun Rev.* 2009;8(3):233–7.
19. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569–81.
20. Egeland T ME. The role of the laboratory in rheumatology. *Rheum. factors & Clin Rheum.* 1983;9: 135–60.
21. Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, Förger F, Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2004 Sep;63(9):1079–84.
22. Schellekens G a, Visser H, de Jong B a, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):155–63.
23. Andrade LEC LP. Auto-anticorpos contra o sistema filagrina-citrulina no diagnóstico de artrite reumatóide. *Rev. Paul. Reumatol.* 2004;3: 5–6.
24. Neogi T, Aletaha D, Silman AJ, Naden RL, Felson DT, Aggarwal R, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2582–91.
25. Scott, D. L. FW and TWH. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010;376(9746):1094–1108.
26. Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural killer cells and their role in rheumatoid arthritis: friend or foe?. *Scientific World Journal.* 2012 Jan;2012:491974.

27. Jorgensen C. Mesenchymal stem cells in arthritis: role of bone marrow microenvironment. *Arthritis Res. Ther.* 2010 Jan;12(4):135.
28. Maumus M, Guérit D, Toupet K, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem Cell Res. Ther.* 2011 Jan;2(2):14.
29. Klareskog L, Catrina AI PS. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2009;373(9664):659–72.
30. Carlens C, Hergens M-P, Grunewald J, Ekblom A, Eklund A, Höglund CO, et al. Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2010 Jun 1;181(11):1217–22.
31. Barton A, Worthington J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. *Arthritis Rheum.* 2009 Oct 15;61(10):1441–6.
32. McInnes IB SG. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429–442.
33. Kurreeman F a S, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med.* 2007 Sep;4(9):e278.
34. Henriques A, Gomes V, Duarte C, Pedreiro S, Carneiro T, Areias M, et al. Distribution and functional plasticity of peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2013 Aug;33(8):2093–9.
35. Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2010 Jan;12(6):210.
36. Kastrinaki M, Papadaki HA. Mesenchymal Stromal Cells in Rheumatoid Arthritis : Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cell Research & Therapy.* 2009;61–9.
37. Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004;1079–85.
38. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2008;118(11).
39. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 2008 Feb;117(2):244–79.
40. Almeida-oliveira A, Diamond HR. Atividade Antileucêmica das Células Natural Killer (NK). *Revista Brasileira de Cancerologia.* 1970;54(3):297–305.
41. Fogel L a, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res. Ther.* 2013 Jan;15(4):216.

42. Tyndall A, Walker U a, Cope A, Dazzi F, De Bari C, Fibbe W, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Res. Ther.* 2007 Jan;9(1):301.
43. Bouffi C, Djouad F, Mathieu M, Noël D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit?. *Rheumatology.* 2009 Oct;48(10):1185–9.
44. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy.* 2012;1–9.
45. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol. Elsevier.* 2012 Mar;33(3):136–43.
46. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes.* 2008 Jul;57(7):1759–67.
47. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, Nöth U, Tuan RS. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Transl. Med.* 2012 Mar;1(3):237–47.
48. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells : mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy.* 2010;1–7.
49. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2010;1–8.
50. Patwardhan, B.; Kalbag, D.; Patki, P.; Nagsampagi B. Search of immunomodulatory agents: a review. *Indian Drugs.* 1990;28(2):348–58.
51. Makare, N.; Bodhankar, S.; Rangari V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Ethnopharmacol.* 2001.
52. Phillipson JD. 50 years of medicinal plant research-every progress in methodology is a progress in science. *Stuttgart.* 2003.
53. Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far?. *Immunol. Cell Biol. Nature Publishing Group.* 2013 Jan;91(1):40–51.
54. Rodriguez JP, Murphy MP, Hong S, Madrigal M, March KL, Minev B, et al. Autologous stromal vascular fraction therapy for rheumatoid arthritis: rationale and clinical safety. *Int. Arch. Med. BioMed Central Ltd.* 2012 Jan;5(1):5.
55. Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM.* 2010 Mar;103(3):139–46.

56. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2013 Jan;4(5):125.
57. Germain RN, Meier-schellersheim M, Nita-lazar A, Iain DC. Systems Biology in Immunology-A Computational Modeling Perspective. 2011;527–85.
58. Schmitt CE, Lizama CO, Zovein AC. From transplantation to transgenics: mouse models of developmental hematopoiesis. *Exp. Hematol. ISEH - International Society for Experimental Hematology.* 2014 Aug;42(8):707–16.
59. Bertha G, Robledo V. Linfócitos. *Medigraphic Literatura Biomédica.* 2009;52(6):276–7.
60. Júnior DM, Antônio J, Araújo P, Tiekko T, Catelan T. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. 2010;55(11).
61. Leavenworth JW, Wang X, Schellack C, Spee P, Cantor H. Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis. *PNAS.* 2011;1–6.
62. González M A, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2009 Apr;60(4):1006–19.
63. Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J. Transl. Med.* 2014 Jan;12(1):157.
64. Baptista MJG. Caracterização fenotípica de linfócitos T e de células NK : acção da IL-2. Universidade Porto. 2002.
65. Garcia MP. Células Natural Killer em uma coorte de pacientes com artrite reumatóide tratados com rituximabe. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013 Dec.
66. Fernando A. Arosa EMC, Francisco C. Pacheco. Fundamentos de Imunologia. In: Lda L-ET, editor. 2005.
67. Amorin BS, Valin VS, Lemos NT, et al. Mesenchymal Stem Cell-Characterization, Cultivation, Immunological properties and clinical applications. *Rev HCPA.* 2012;32(1).
68. Féteira, L. Aplicação de terapia regenerativa mediante recurso a células estaminais mesenquimatosas em cavalos de desporto: menção de dois casos clínicos com diagnóstico a nível articular e tendinoso. Universidade Técnica de Lisboa. 2013.
69. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007.
70. Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. 2007 June.

71. Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nature Reviews*. 2007.