



**Sofia de Jesus
Gomes Duarte**

**Efeito das células mesenquimais da matriz do
cordão umbilical nos linfócitos T de sangue
periférico e biópsias de baço e gânglio**

**Effect of mesenchymal cells from umbilical cord
matrix on T lymphocytes from peripheral blood,
spleen and lymph node biopsies**



**Sofia de Jesus
Gomes Duarte**

Efeito das células mesenquimais da matriz do cordão umbilical nos linfócitos T de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio

Effect of mesenchymal cells from umbilical cord matrix on T lymphocytes from peripheral blood, spleen and lymph node biopsies

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio institucional:



Dedico este trabalho aos meus pais e irmão.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva
Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia
Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Prof. Doutor Mário Grãos
Investigador Auxiliar, Laboratório de Biologia Celular do Biocant/Centro de
Neurociências e Biologia Molecular de Coimbra (CNC)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Artur Paiva, pela orientação científica, disponibilidade e apoio que me transmitiu ao longo deste ano, essencial à concretização deste projeto.

À minha coorientadora, Professora Doutora Rosário Domingues, por toda a sua disponibilidade, ajuda e encorajamento.

Ao Instituto Português do Sangue e da Transplantação, em especial ao Professor Doutor António Martinho, pela oportunidade, disponibilidade e conhecimentos transmitidos. Um muito obrigado a toda a equipa da área funcional da Transplantação, em especial à Maria de Jesus Inácio e Ana Sofia Gonçalves, por todos os ensinamentos e por toda a indispensável ajuda.

Ao Laboratório de Biologia Celular do Centro de Neurociências e Biologia Celular (UC-Biotech), em particular ao Professor Doutor Mário Grãos, por esta colaboração sem a qual o projeto não seria possível de realizar. Um enorme obrigado em especial à Daniela Alves Ferreira por todos os ensinamentos, disponibilidade, ajuda e apoio.

A toda a equipa da Unidade de Gestão Operacional de Citometria de Fluxo do CHUC, em especial à Isabel Silva e Susana Pedreiro, pela infinita disponibilidade, ajuda e suporte.

À Ana Lopes, Cátia Simões e Catarina Maia por todos os momentos de amizade partilhados. Um muito obrigado por toda a ajuda e suporte ao longo deste ano.

Aos meus amigos por terem estado sempre do meu lado, por darem confiança e força para que acreditasse em mim e de que era capaz. Um obrigado especial à Diana Costa, Filipa Abreu e Mariana Santos.

À minha família por serem o meu pilar ao longo desta etapa da minha vida. Um enorme obrigada!

Palavras-chave

Sistema imune, Células mesenquimais do estroma, Linfócitos T, Imunomodulação

Resumo

O sistema imune é responsável pela resposta imunológica efetiva e bem coordenada, fundamental na defesa do organismo. Os linfócitos T são elementos importantes dessa resposta, tanto por produzirem reações imunológicas específicas para combater infecções e neoplasias, como também por dirigirem e regularem as respostas imunes. As células mesenquimais do estroma (MSCs) são células multipotentes, com a capacidade de autorrenovação e de diferenciação em linhagens de células mesodérmicas. Nos últimos anos, vários estudos mostraram que as MSCs produzem diversos fatores solúveis que exercem efeitos imunossupressores, modulando tanto a resposta imune inata como a adaptativa. Devido a estas suas propriedades, as MSCs têm sido consideradas como uma possível estratégia terapêutica para a regulação negativa de respostas imunes exacerbadas, como as que ocorrem nas doenças autoimunes e noutras doenças com inflamação exacerbada. O cordão umbilical tem sido uma das fontes de MSCs alternativa à medula óssea, uma vez que a recolha das células é simples, segura e não invasiva; as células apresentam os marcadores típicos de MSCs, baixa imunogenicidade e elevada proliferação.

O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da ação imunomoduladora das MSCs da matriz do cordão umbilical em diferentes subpopulações de linfócitos T de sangue periférico e de biópsias de baço e gânglio linfático pertencentes à mesma pessoa (4 doadores cadáveres de órgãos ou tecidos para transplante).

Para este efeito, células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio foram cultivadas com e sem adição de MSCs e com posterior ativação, *in vitro*, com PMA e ionomicina. As percentagens de linfócitos T produtores de citocinas intracelulares (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e IL-9) foram determinadas por citometria de fluxo, bem como, a caracterização imunofenotípica dessas células. Procedeu-se, também, à quantificação de mRNA de IL-4, IL-5, IL-10 em linfócitos T e de IDO em MSCs purificadas.

Este estudo mostrou que a presença das MSCs da matriz do cordão umbilical induziu uma diminuição da frequência de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e T CD4+CD8+ produtores de citocinas pró-inflamatórias, quer provenientes do sangue periférico, do baço ou do gânglio linfático, com exceção das células Th produtoras de IL-10, particularmente as do sangue periférico. A expressão de mRNA de IDO pelas MSCs na presença de MNCs do baço e do gânglio foi superior à observada na presença de MNCs do SP.

Com base nos resultados obtidos, as MSCs da matriz do cordão umbilical parecem exercer uma ação inibidora semelhante nos linfócitos T provenientes do sangue periférico, baço e gânglio linfático, o que reforça a aplicabilidade destas células no tratamento de patologias imunológicas.

Keywords

Immune system, Mesenchymal stromal cells, T lymphocytes, Immunomodulation.

Abstract

The immune system is responsible for effective and well-coordinated immune response, crucial in the organism defending. T lymphocytes are key elements of that response, either by producing specific immune responses to fight infections and neoplasms, as well as for driving and regulating immune responses. The mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotent cells with the ability of self-renewal and differentiate into mesodermal cell lineages. In recent years, several studies have shown that MSCs produce various soluble factors that exert immunosuppressive effects by modulating both the innate and adaptive immune response. Due to their properties, MSCs have been considered as potential therapeutic strategy for downregulation exacerbated immune responses in autoimmune and inflammatory diseases and tissue repair. The umbilical cord has been one of the alternative MSCs sources to bone marrow, since the cells collection is simple, safe and non-invasive; the cells show the typical MSCs markers, low immunogenicity and high proliferation.

The aim of this study was to perform a comparative study of the immunomodulatory action of MSC from umbilical cord matrix on different subpopulations of T lymphocytes from peripheral blood, spleen and lymph node biopsies belonging to the same person (4 cadaver donor of organs and tissues for transplantation). For this purpose, mononuclear cells from peripheral blood, spleen and lymph node were cultured with and without addition of MSCs and with subsequent activation *in vitro* with PMA and ionomycin. The percentages of lymphocytes T producing intracellular cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 and IL-9) were determined by flow cytometry, as well as the immunophenotypic characterization of these cells. The mRNA expression was also evaluated by the quantification of mRNA of IL-4, IL-5 and IL-10 in T lymphocytes and IDO in MSCs.

This study showed the presence of MSCs from umbilical cord matrix induced a decrease on the frequency of Th, Tc, T $\gamma\delta$ and TCD4+CD8+ lymphocytes producers of pro-inflammatory cytokines, from peripheral blood, spleen and lymph node, except for Th cells producing IL-10, particularly from peripheral blood. The mRNA expression of IDO by MSCs in the presence of MNCs from spleen and lymph node was higher than the expression by MSCs isolated or in the presence of MNCs from SP.

Based on these results, the MSCs from umbilical cord matrix seem to have a similar inhibitory effect on T lymphocytes from peripheral blood, spleen and lymph node, which reinforces the applicability of these cells in the treatment of autoimmune diseases.

Índice

Siglas e Abreviaturas	vi
1. Introdução	1
1.1. Sistema imunitário	1
1.1.1. Linfócitos T	3
1.1.1.1. Linfócitos T citotóxicos	4
1.1.1.2. Linfócitos T auxiliares	5
1.1.1.3. Linfócitos T reguladores	6
1.1.1.4. Linfócitos T $\gamma\delta$	7
1.2. Células mesenquimais do estroma	8
1.2.1. Caracterização e propriedades	8
1.2.2. Fontes de isolamento de MSCs	10
1.2.3. Imunomodulação mediada por MSCs	12
1.2.4. Mecanismos de imunomodulação das MSCs	14
2. Objetivos	18
3. Material e métodos	19
3.1. Isolamento e cultura de MSCs a partir da matriz do cordão umbilical	19
3.1.1. Criopreservação de MSCs	20
3.2. Isolamento de células mononucleares por gradiente de densidade	20
3.3. Caracterização imunofenotípica das populações e subpopulações de linfócitos das amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio	21
3.4. Co-cultura de MSCs derivadas da matriz do cordão umbilical com MNCs de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio	23
3.5. Caracterização funcional das subpopulações de linfócitos T através da produção de citocinas intracelulares	24
3.6. Aquisição e análise por Citometria de Fluxo	25
3.7. Separação e purificação de subpopulações de linfócitos T e MSCs	25
3.8. Análise da expressão génica de linfócitos Th, Tc e T $\gamma\delta$ e MSCs	26
3.9. Análise estatística	26
4. Resultados	27
4.1. Caracterização imunofenotípica das diferentes subpopulações de linfócitos T (Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+) e sua distribuição nos compartimentos naïve, memória e efetor; dos linfócitos B e das células NK, nas amostras de sangue periférico e nas biópsias de baço e de gânglio	27
4.2. Caracterização funcional das subpopulações de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ através da produção das citocinas intracelulares na presença e ausência de MSCs	29
4.3. Análise da expressão génica em linfócitos Th, Tc e T $\gamma\delta$ e MSCs	39

4.3.1. Expressão de mRNA dos genes IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos Th e Tc	40
4.3.2. Expressão de mRNA do gene da perforina pelos linfócitos T $\gamma\delta$	41
4.3.3. Expressão de mRNA do gene da IDO pelas MSC	42
5. Discussão	44
6. Conclusão	50
7. Referências bibliográficas	51

Índice de Figuras

Figura 1 – Imunidade inata e imunidade adaptativa. Representação simplificada dos principais mecanismos e células envolvidas nas respostas imunes inata e adaptativa. 2

Figura 2 – Multipotencialidade das células mesenquimais do estroma. As células mesenquimais do estroma têm a capacidade de autorrenovação (seta curva), diferenciação na linhagem mesodérmica (seta reta contínua) e transdiferenciação nas linhagens endodérmica e ectodérmica (seta tracejada). 9

Figura 3 – Compartimentos do cordão umbilical. As MSCs podem ser isoladas a partir de sangue do cordão umbilical, da matriz do cordão umbilical (Wharton's Jelly) e da camada subendotelial da veia umbilical. 11

Figura 4 - Possível mecanismo dos efeitos imunomodulatórios das MSCs nas células do sistema imune. Os vários fatores solúveis secretados pelas MSCs estão associados às suas propriedades imunomoduladoras sobre as células do sistema imune. 15

Figura 5 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ nos seus compartimentos funcionais, de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio. Após o isolamento por gradiente de densidade das MNCs de SP, baço e gânglio linfático, foram quantificadas as subpopulações: linfócitos Th (CD3+CD4+CD8-), linfócitos Tc (CD3+CD8+CD4-), linfócitos T $\gamma\delta$ (CD3+CD4-CD8-) e linfócitos TCD4+CD8+, bem como a sua distribuição nos compartimentos naïve (CD45RA+CD27+), memória central (MC) (CD45RA-CD27+), memória efetora (ME) (CD45RA-CD27-) e efetor (CD45RA+CD27-). As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*, teste Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/baço vs. gânglio).....30

Figura 6 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th1 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após cocultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th TNF- α +, IFN- γ + e IL-2+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*, teste t-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).....33

Figura 7 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos Tc1 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-

cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Tc TNF- α +, IFN- γ + e IL-2+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).....34

Figura 8 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th17 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th IL-17+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço)..35

Figura 9 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th9 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th IL-9+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).....36

Figura 10 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th produtores de IL-10 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th IL-10+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC).....37

Figura 11 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de TNF- α e IFN- γ de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos T $\gamma\delta$ TNF- α + e IFN- γ +. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).....38

Figura 12 - Representação gráfica da percentagem de linfócitos T CD4CD8 produtores de TNF- α , IFN- γ e IL-2 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos T CD4+CD8+ TNF- α + e IFN- γ +. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).
39

Figura 13 - Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos Th purificados, de biópsias de baço e gânglio, após cultura na presença e ausência de MSCs com ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC).
40

Figura 14 - Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos Tc purificados, de biópsias de baço e gânglio, após cultura na presença e ausência de MSCs com ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p-value <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC).
41

Figura 15 - Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de perforina em linfócitos T $\gamma\delta$ purificados, de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, após cultura na presença e ausência de MSCs com ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p <0,05 (*,teste t-student: sem MSC vs. com MSC).
42

Figura 16 - Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA deIDO em MSC purificadas, após cultura sem e com MNCs de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio e após ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p <0,05 (*,teste ANOVA I: MSC vs. MSC+SP vs. MSC+baço vs. MSC+gânglio).
43

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Marcadores de superfície expressos pelas MSCs de cordão umbilical e medula óssea.....	11
Tabela 2 - Painéis de anticorpos monoclonais para caracterização imunofenotípica e separação celular. Combinações de reagentes com seus respectivos clones e marcas.....	22
Tabela 3 - Média das percentagens, desvio padrão e significância estatística das diferentes populações de células mononucleares de SP, baço e gânglio.....	28
Tabela 4 - Média das percentagens, desvio padrão e significância estatística das diferentes subpopulações analisadas após co-cultura de MNCs de SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina (*, significado estatístico quando p-value <0,05 pelo teste t-student: sem MSC vs. com MSC)..	31
Tabela 5 - Média das percentagens de inibição, desvio padrão e significância estatística das diferentes subpopulações analisadas após co-cultura de MNCs de SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação in vitro com PMA e ionomicina.	32

Siglas e Abreviaturas

Ang-1	Angiopietina-1
APC	Célula apresentadora de antígeno
BrPP	Bromohidrina pirofosfato
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CLP	Célula progenitora linfoide
CMP	Célula progenitora mieloide
COX	Ciclooxigenase
EPO	Eritropoietina
Foxp3	<i>Forkhead box 3</i>
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA	Antígeno leucocitário humano
HSC	Célula <i>stem</i> hematopoiética
IDO	Indoleamida 2,3-dioxigenase
IFN-γ	Interferão- γ
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
iNOS	Sintetase do óxido nítrico induzível
IPP	Isopentenilpirofosfato
MHC	Complexo <i>major</i> de histocompatibilidade
MNC	Célula mononuclear
MSC	Célula mesenquimal do estroma
NFKB	Fator nuclear KB
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	Fitohemaglutinina
SDF-1	Fator derivado de células do estroma tipo 1
SI	Sistema imunitário
SP	Sangue periférico
STAT	Ativador e transdutor de sinais de transcrição
Tc	Linfócito T citotóxico
T_{CM}	Linfócito T de memória central
T_{EM}	Linfócitos T de memória efetora

TCR	Recetor de linfócito T
TGF-β	Fator de crescimento transformante β
TNF-α/β	Fator de necrose tumoral α/β
Th	Linfócito T auxiliador
Treg	Linfócito T regulador

1. Introdução

1.1. Sistema Imunitário

O organismo humano dispõe de um importante sistema imunitário (SI), que é fundamental nos seus mecanismos de defesa [1]. O SI é constituído por um conjunto de diferentes órgãos, uma grande variedade de células (por exemplo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, monócitos, células *natural killer* (NK) e linfócitos T e B) e múltiplos fatores solúveis (por exemplo IFN (interferão) γ , TNF (fator de necrose tumoral) α e uma variedade de interleucinas). Todos estes componentes permitem uma resposta imunológica efetiva e bem coordenada. Para além de proteger o organismo de ameaças externas, o SI é capaz de reconhecer e combater células do próprio, nomeadamente no caso de células tumorais e como acontece nas doenças auto-imunes, e de preservar o equilíbrio homeostático do organismo [1].

A resposta do SI, também designada por resposta imune, pode ser dividida em dois grupos, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (**Figura 1**), dependendo dos mecanismos de defesa envolvidos [2]. A imunidade inata consiste numa primeira linha de defesa inicial e resume-se à resposta imediata a um estímulo agressor. Este tipo de resposta consiste na ação combinada de diferentes componentes, como as barreiras de defesa (anatômica, fisiológica e inflamatória), células fagocíticas, células *natural killer*, proteínas efectoras no sangue e citocinas que são responsáveis pela coordenação de diversas atividades celulares. Uma vez que estes componentes não respondem de forma específica a um determinado antígeno, a resposta inata é inespecífica [2,3]. As células do sistema inato reconhecem estimuladores imunes associados aos patogénicos, uma vez que estes ocorrem em padrões repetidos. Além disto, a imunidade inata tem também um papel fundamental na ativação da imunidade adaptativa [3]. Se a imunidade inata não for suficiente na eliminação ou neutralização dos antígenos, então desencadeia-se uma resposta imune adaptativa [3].

A imunidade adaptativa consiste numa resposta imunológica também estimulada pela exposição a antígenos, mas cuja capacidade defensiva aumenta após exposições posteriores – memória imunológica [2,3]. Em oposição à resposta imune inata, a imunidade adaptativa requer algum tempo para reagir contra um organismo invasor, sendo considerada a segunda linha de defesa, e tem a capacidade de reconhecimento do próprio e do não próprio do organismo [3]. A resposta imune adaptativa é altamente específica para um antígeno e reage

somente contra o antígeno que induziu a resposta. Este tipo de resposta consiste na ação dos linfócitos B através da produção de anticorpos, após a sua diferenciação em plasmócitos, e dos linfócitos T através da produção de citocinas e de uma resposta citotóxica específica contra as células que expressam o antígeno que esteve na base dessa resposta imune. A estimulação de linfócitos *naïve* por antígenos gera células de memória de longa vida e estas células apresentam características que as tornam mais eficientes na resposta e na eliminação do antígeno do que os linfócitos *naïve* [3].

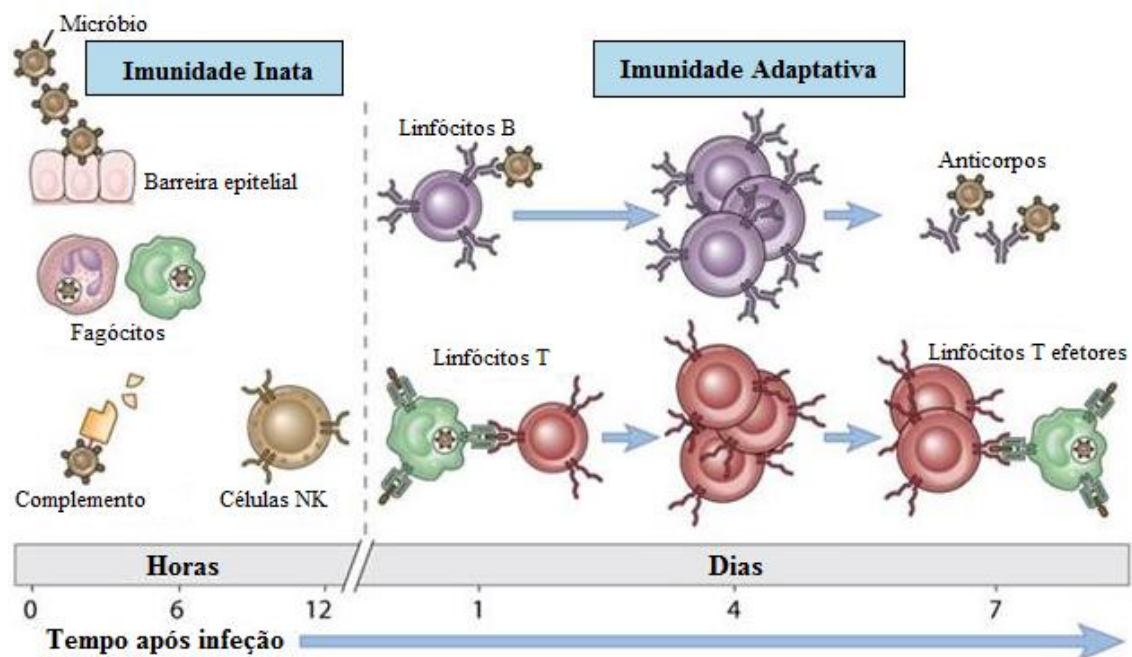


Figura 1- Imunidade inata e imunidade adaptativa. Representação simplificada dos principais mecanismos e células envolvidas nas respostas imunes inata e adaptativa. Adaptado de Abbas (2).

Todas as células do SI têm origem na medula óssea por um processo designado por hematopoiese [4]. Este processo consiste na formação, desenvolvimento e maturação de elementos sanguíneos a partir de células *stem* hematopoiéticas (HSCs). Estas células são pluripotentes e têm a capacidade de autorrenovação, mantendo assim o nível populacional de todas as linhagens de células sanguíneas através de sucessivas divisões celulares [5]. Inicialmente na presença de células do estroma, de componentes da matriz extracelular e sob a ação de vários fatores de crescimento e citocinas, as HSCs diferenciam-se em células

progenitoras linfoides (CLPs) e células progenitoras mieloides (CMPs) [4,6]. As CMPs dão origem aos eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, células dendríticas mieloides, mastócitos e plaquetas enquanto as CLPs dão origem às células *natural killer*, linfócitos B e T e células dendríticas plasmacitóides [4,5]. Seguidamente, será feita uma revisão mais detalhada sobre os linfócitos T, uma vez que estas células são o objeto de estudo deste trabalho.

1.1.1. Linfócitos T

Os linfócitos constituem um grupo de células homogêneas em morfologia mas com uma grande diversidade de linhagem, funções e fenótipo, expressando recetores específicos para os antigénios [7]. Estas células têm origem na medula óssea e de acordo com o seu local de maturação é possível dividir os linfócitos em subgrupos: linfócitos B e T, que maturam na medula óssea e timo, respetivamente [8]. As células *natural killer* são linfócitos que são componentes do sistema imune inato, com função semelhante a alguns linfócitos T, podendo reconhecer e exercer uma função citotóxica contra células infetadas por vírus ou bactérias e contra células tumorais. Ao contrário dos linfócitos T e B, as células *natural killer* não possuem os recetores específicos para os antigénios [7].

Os linfócitos T, apesar de terem origem na medula óssea, migram desta para a glândula do timo, onde sofrem maturação [9]. Ao longo das inúmeras fases da sua maturação, os linfócitos T passam a expressar vários recetores membranares específicos, entre os quais o recetor das células T para o antigénio (TCR), a molécula de diferenciação CD3 presente em todos os linfócitos T maduros e os recetores CD4 e CD8 [2]. No córtex do timo, os timócitos expressam pela primeira vez o TCR $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$, e as células T que expressam o TCR $\alpha\beta$ começam a diferenciarem-se em linfócitos T CD4+ ou T CD8+ [9]. O reconhecimento do antigénio por parte dos linfócitos T é possível devido ao seu TCR expresso à superfície destas células [7]. Contudo, o TCR dos linfócitos T só é capaz de reconhecer peptídeos apresentados pelas células apresentadoras de antigénios (APCs), quando estes se encontram ligados às moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) [3,7]. Os macrófagos, linfócitos B e células dendríticas são classificadas como APCs [3,7].

As moléculas do MHC são divididas em dois tipos, as moléculas de classe I e as de classe II [7,10]. Nos órgãos linfoides secundários, os linfócitos que ainda não reconheceram o antígeno, designados por linfócitos *naïve*, têm apenas a capacidade de o reconhecer, mas não conseguem executar uma ação de defesa contra o mesmo. Após o reconhecimento do antígeno, o linfócito T *naïve* prolifera e diferencia-se em células de memória ou efetoras [10]. Os linfócitos T de memória formam um reservatório, permitindo uma resposta mais rápida e potente contra uma segunda exposição ao antígeno [10,11]. Este compartimento funcional de linfócitos T pode ser dividido em memória central (T_{CM}) e memória efetora (T_{EM}). Os linfócitos T_{CM} são responsáveis pela expansão rápida, em caso de reexposição ao antígeno. Após a reexposição e reconhecimento do antígeno, os linfócitos T_{CM} diferenciam-se rapidamente em linfócitos T_{EM} que possuem funções efetoras. Os linfócitos T efetores são outro compartimento funcional de células diferenciadas que têm a capacidade de produzir citocinas e/ou de exercer citotoxicidade celular e participar assim na resposta imune contra o antígeno [10,11].

1.1.1.1. Linfócitos T citotóxicos

Os linfócitos T citotóxicos (T_c) têm como principal função a destruição das células infectadas por vírus, células neoplásicas ou células alogénicas, através da libertação de proteínas que formam poros na membrana das células-alvo [10]. Esta função lítica pode ser desempenhada por duas vias. Na primeira via, os linfócitos T_c libertam perforina que irá polimerizar a membrana plasmática da célula-alvo, formando poros na mesma [3,7]. Desta forma, a granzima B poderá entrar na célula-alvo, ativando a cascata proteolítica das caspases e levando à morte celular por apoptose. Na segunda via, os linfócitos T_c ativam indiretamente a cascata das caspases. A proteína Fas ligando, presente na superfície dos linfócitos T_c , liga-se a proteínas Fas que se encontram na superfície da célula-alvo. Esta ligação promove a ativação da cascata de caspases e consequentemente a apoptose celular [3,7]. Contudo, a função dos linfócitos T_c não se limita à eliminação de células-alvo. Estas células também participam noutros mecanismos de defesa do organismo, através da produção de citocinas, entre as quais o $IFN-\gamma$ e o $TNF-\alpha$ [7].

Os linfócitos Tc expressam na sua superfície o TCR e os co-recetores CD3 e CD8 [10]. O complexo TCR/CD3/CD8 reconhece o antígeno apresentado pelas moléculas MHC classe I presentes na superfície das APCs. Após a ativação, os linfócitos Tc tornam-se células efetoras, desencadeando-se os mecanismos de defesa [10].

1.1.1.2. Linfócitos T auxiliares

Os linfócitos T auxiliares (Th) são as células do SI responsáveis pela coordenação da resposta imune contra o antígeno, uma vez que libertam citocinas para autoestimulação e estimulação de outros leucócitos [10]. Estas células expressam na sua superfície os TCRs e os co-recetores CD3 e CD4. O complexo TCR/CD3/CD4 reconhece o antígeno apresentado pelas moléculas do MHC classe II presentes na superfície das APCs [10].

Os linfócitos Th *naïve* (Th0) podem diferenciar-se em diferentes subgrupos que apresentam diferentes funções, sendo que esta divisão deve-se ao padrão de citocinas que secretam [3]. Esta diferenciação é condicionada pelo ambiente de citocinas aquando do estímulo fornecido pela APC. A presença de interleucina (IL) 4 favorece um linfócito Th0 a diferenciar-se em Th2, enquanto a diferenciação em Th1 é favorecida pela presença de IL-12 [3].

Os linfócitos Th1 produzem um padrão de citocinas constituído pela IL-2, IFN- γ e TNF- α/β [10]. As principais funções deste subgrupo de linfócitos são a indução da proliferação de linfócitos T, ativação de macrófagos e células *natural killer*, aumento da produção da imunoglobulina G e estimulação das APCs [7].

O padrão de citocinas IL-4, 5, 6, 9, 10 e 13 é característicos dos linfócitos Th2 [10]. A ativação de eosinófilos e mastócitos, aumento da produção de IgE e aumento da produção de componentes da matriz extracelular pelos macrófagos são as principais características destas células [7].

Por sua vez, os linfócitos Th17 produzem as citocinas IL-17, 21 e 22 [7]. A IL-17, citocina característica destas células, tem uma forte capacidade indutora da inflamação, induzindo a infiltração de neutrófilos e monócitos [12]. Estes linfócitos têm ainda como função a estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias [12].

Para além destes linfócitos Th existem ainda outros subgrupos menos conhecidos como os linfócitos Th9, Th22 e Tfh. Os linfócitos Th9 estão associados a um padrão de citocinas constituído pela IL-9 e IL-10 e estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra parasitas extracelulares, principalmente nematoides [13]. Apesar de produzirem a citocina anti-inflamatória IL-10, estes linfócitos promovem a inflamação alérgica. O seu papel noutras doenças inflamatórias ainda permanece incerto, pois este subgrupo só foi caracterizado recentemente. Os linfócitos Th22 produzem IL-22 e foram identificados em doenças inflamatórias da pele. O seu papel na defesa do hospedeiro ainda não é claro, mas este subgrupo parece estar envolvido na regulação da cicatrização da pele [7,13]. Os linfócitos T auxiliares foliculares (Tfh) estão envolvidos na promoção de respostas dos centros germinativos e desenvolvimento de células B produtoras de anticorpos e memória [13,14].

1.1.1.3. Linfócitos T reguladores

Os linfócitos T reguladores (Treg) são as células mais importantes nos mecanismos supressores e da tolerância imune, quer através do contacto célula a célula quer pela produção de fatores solúveis [15]. As principais funções destes linfócitos são a inibição da atividade das APCs, linfócitos Tc, células *natural killer* e monócitos e da produção de citocinas [7].

A maioria dos linfócitos Treg expressam na sua superfície o co-recetor CD4, mas também existem linfócitos Treg que expressam CD8 [7,16]. Estas células expressam o fator de transcrição Foxp3, essencial para o desenvolvimento das funções reguladoras, e exibem uma elevada expressão de CD25, cadeia alfa do recetor da IL-2 [16].

Os linfócitos Treg podem ser divididos em dois tipos principais, os naturais e os induzidos. Os linfócitos Treg naturais têm um fenótipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e não proliferam em resposta a estímulos externos. Estas células têm como função a supressão da atividade efetora de potenciais linfócitos T autorreativos, através do contato intercelular [16]. Por outro lado, os linfócitos Treg induzidos são células supressoras secundárias. Estas células são geradas diretamente a partir de linfócitos T CD4⁺, por estimulação do complexo TCR/CD3, na presença de IL-10 e TGF- β [16–18]. Os linfócitos Treg estimulados na presença de IL-10 apresentam o fenótipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ e têm a capacidade de

produzir IL-10, inibindo a resposta imune; enquanto os linfócitos Treg induzidos por TGF- β têm um fenótipo CD4+CD25+Foxp3+ e inibem através da produção de TGF- β [16–18].

1.1.1.4. Linfócitos T $\gamma\delta$

Os linfócitos T $\gamma\delta$ expressam uma forma de TCR distinto do "tradicional", sendo TCR composto por uma cadeia γ e outra δ [7]. Estas células expressam ainda o co-recetor CD3 e normalmente não expressam CD4 e CD8. Estas células parecem ter um papel quer na imunidade inata quer na adaptativa [19,20]. Algumas dessas funções são: responderem rapidamente, reconhecerem antígenos que não sejam proteínas, expressarem recetores de superfície que geram memória imunológica, induzirem a maturação das células dendríticas e ainda são capazes de apresentar antígenos às células T $\alpha\beta$.

As células T $\gamma\delta$ ativadas apresentam atividade citotóxica, sendo a granzima B e a perforina as principais moléculas citotóxicas expressas por estas células [21]. Vários estudos também já demonstraram que os linfócitos T $\gamma\delta$ também produzem citocinas, como o TNF- α , o IFN- γ , a IL-2 e a IL-17 [22–25].

Os linfócitos T são elementos importantes da resposta imune, tanto por produzirem reações imunológicas específicas para combater infeções e outras doenças, como também por dirigirem e regularem as respostas imunes [7,26,27]. No entanto, quando os linfócitos T não seguem os padrões de resposta adequados, pode-se desenvolver respostas imunes pró-inflamatórias exacerbadas. Desta forma, os linfócitos T têm um papel crucial nas doenças inflamatórias e autoimunes. Nos últimos anos, vários estudos têm apontado as células mesenquimais do estroma como uma estratégia terapêutica para a regulação negativa das respostas imunes exacerbadas nestas patologias [28,29].

1.2. Células Mesenquimais do Estroma

1.2.1. Caracterização e propriedades

As células mesenquimais do estroma (MSCs) são uma população rara, heterogênea e multipotente de células estaminais não-hematopoiéticas [30]. Morfologicamente, as MSCs são células fusiformes, semelhantes a fibroblastos e apresentam capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diferentes linhagens germinativas. Quanto à sua imunogenicidade, estas células apresentam fraca expressão de moléculas MHC de classe I, ausência de expressão de moléculas MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, não induzindo uma resposta alérgica por parte dos linfócitos T [30].

Um problema da identificação e caracterização de MSCs é a falta de um marcador específico [28]. Segundo a *Internacional Society for Cellular Therapy* são necessários três requisitos mínimos para uma população ser classificada como MSC: 1) capacidade de aderência em cultura à superfície do plástico; 2) mais de 95% das células em cultura devem expressar as moléculas de superfície CD105, CD73 e CD90 e, adicionalmente, as moléculas CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR devem estar ausentes; 3) capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos [31].

As MSCs podem diferenciar-se em células especializadas (**Figura 2**) mas têm um potencial de diferenciação mais limitado que as células estaminais embrionárias [32,33]. Esta diferenciação depende das condições experimentais/fisiológicas, sendo conduzida por genes reguladores específicos, tratamento com fatores de crescimento, indução química e microambiente da cultura. A capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* [31]. Recentemente, vários estudos revelaram que as MSCs podem diferenciar-se *in vitro* em outros tipos de linhagens celulares, como as linhagens ectodérmica e endodérmica, por um processo denominado de transdiferenciação [33]. Porém, este processo não foi confirmado *in vivo*.

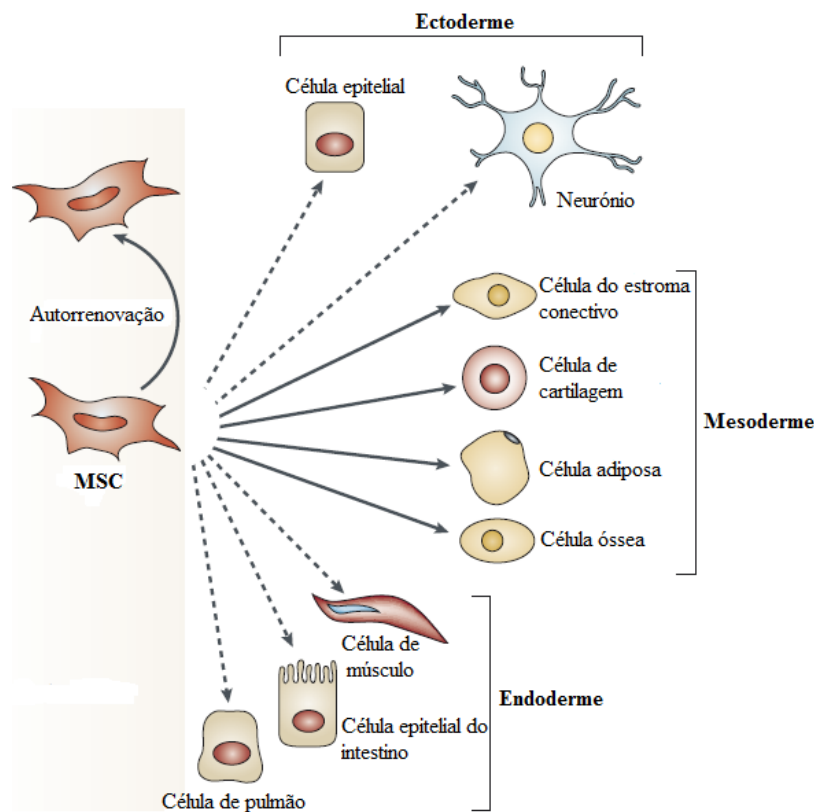


Figura 2- Multipotencialidade das células mesenquimais do estroma. As células mesenquimais do estroma têm a capacidade de autorrenovação (seta curva), diferenciação na linhagem mesodérmica (seta reta contínua) e transdiferenciação nas linhagens endodérmica e ectodérmica (seta tracejada). Adaptado de Uccelli [33].

Uma outra característica das MSCs é a sua capacidade de migração para os tecidos lesados [34]. As MSCs respondem a alguns agentes quimioatrativos e expressam recetores de quimiocinas, permitindo assim a sua mobilização para os tecidos-alvo [35]. Esta capacidade de mobilização para os tecidos aliada à capacidade de diferenciação coloca as MSCs como potenciais células regeneradoras de tecido. No microambiente específico da lesão, as MSCs são estimuladas pelas baixas tensões de oxigénio, toxinas exógenas e citocinas pró-inflamatórias, estimulação esta que permite a ação das MSCs no sentido de ajudar na reparação do tecido através da libertação de fatores parácrinos [36]. A angiopoietina-1 (Ang-1), eritropoietina (EPO), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e fator derivado de células estaminais tipo 1 (SDF-1) são alguns exemplos de fatores parácrinos que contribuem para o efeito terapêutico das MSCs através da reparação do tecido, angiogénese, cicatrização de ferida e efeito neuroprotetor [37]. Contudo, as funções biológicas das MSCs

no interior dos tecidos ainda não são completamente compreendidas, mas sabe-se que estas células estão envolvidas na manutenção da homeostase dos tecidos e na modulação da atividade das células do sistema imunitário [28,29].

1.2.2. Fontes de isolamento de MSCs

As MSCs foram originalmente isoladas a partir da medula óssea, no entanto também estão presentes em diversos outros tecidos [38,39]. Estas células representam uma fração muito pequena da população total de células nucleadas da medula óssea (0.001% a 0.01% das células totais), podendo ser isoladas e expandidas eficazmente e com bom rendimento em condições de crescimento *in vitro* [40]. Normalmente, as MSC são isoladas por um gradiente de densidade e separadas das células estaminais hematopoiéticas pela sua capacidade de aderência a superfícies plásticas em placas de cultura celular [41]. Para além do número de células, as MSCs da medula óssea apresentam outras limitações como a diminuição significativa da sua capacidade de proliferação e diferenciação com o aumentar da idade do dador [42]. Além disso, o procedimento para obter estas células é invasivo e doloroso para o paciente, podendo ser seguido por sangramento, dor crónica e risco de infeção [43–45]. Devido a estas limitações, fontes alternativas de MSCs têm sido exploradas, como por exemplo o tecido adiposo, o cordão umbilical, a placenta, entre outros tecidos pós-natais.

O cordão umbilical tem sido usado como uma fonte alternativa de MSCs, uma vez que é rotineiramente descartado após o parto. O procedimento para recolher estas células é simples, seguro e não-invasivo, quando comparado com o aspirado de medula óssea [42,45]. Além disso, as MSCs do cordão umbilical apresentam os marcadores típicos destas células (**Tabela 1**), baixa imunogenicidade e elevada cinética de crescimento como as MSCs da medula óssea [46]. A partir do cordão umbilical, as MSCs podem ser isoladas do sangue do cordão umbilical, da matriz do cordão umbilical (*Wharton's Jelly*) e da camada subendotelial da veia umbilical (**Figura 3**) [47].

Tabela 1 – Marcadores de superfície expressos pelas MSCs do cordão umbilical e da medula óssea. Adaptado de Malgieri [42].

Marcadores de superfície	Cordão Umbilical	Medula óssea
CD13	++++	++++
CD14	-	-
CD29	++++	++++
CD31	-	-
CD34	-	-
CD38	-	-
CD44	++++	++++
CD45	-	-
CD73	++++	++++
CD90	++++	++++
CD105	++++	++++
CD106	+	+++
CD146	++++	+++
HLA-ABC	+++	++++
HLA-DR	-	-

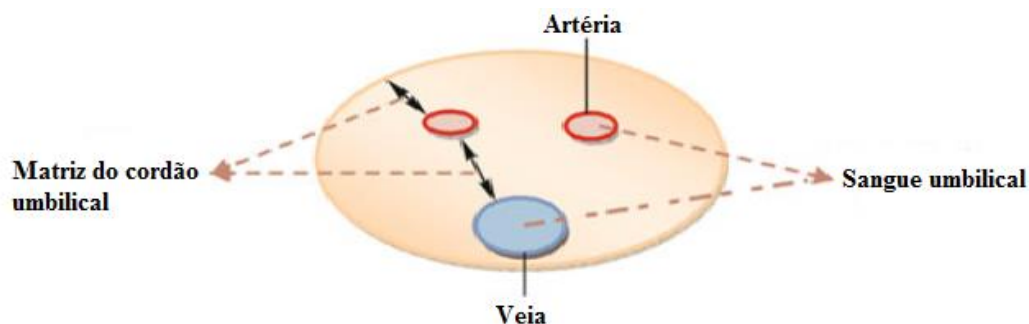


Figura 3- Compartimentos do cordão umbilical. As MSCs podem ser isoladas a partir de sangue do cordão umbilical, da matriz do cordão umbilical (Wharton's Jelly) e da camada subendotelial da veia umbilical. Adaptado de Yang [47].

Apesar desta ampla distribuição, as diferentes populações de MSCs apresentam boas propriedades imunomoduladoras e características que as tornam candidatos promissores no desenvolvimento de terapias para várias doenças, nomeadamente: 1) fácil isolamento a partir de qualquer tecido; 2) elevada cinética de crescimento, que permite uma fácil expansão *in vitro* a partir de pequenas amostras para níveis clínicos; 3) armazenamento por longos períodos de tempo sem perda de multipotencialidade; 4) baixa imunogenicidade, evitando a resposta alérgica e 5) sem levantarem questões éticas [46].

1.2.3. Imunomodulação mediada por MSCs

Ao longo da última década, os estudos com MSCs têm-se redirecionado para a multipotencialidade destas células em relação aos seus possíveis efeitos regulatórios sobre as células do sistema imunológico [33]. As MSCs demonstraram possuir uma elevada capacidade imunoreguladora, que afeta tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. No entanto, o comportamento das MSCs depende de vários fatores, como a fonte de isolamento das células, o tipo de células imunes presentes na cultura celular e o seu estado de ativação e diferenciação, bem como o tipo de estímulo usado [39,48].

Estudos *in vitro* demonstraram que as MSCs inibem a proliferação de linfócitos T estimulados com mitógenos policlonais, células alogênicas ou antígenos específicos [39,49–52]. Esta inibição parece ser mediada pela paragem do ciclo celular dos linfócitos na fase G0/G1 [51,52]. Além disso, vários estudos mostraram que as MSCs influenciam o perfil de secreção de citocinas das diferentes subpopulações de células T [48,50,53,54]. A adição de MSCs a uma cultura de linfócitos T ativados *in vitro* resultou na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17, e no aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10. A diminuição da produção de IFN- γ parece estar relacionada com a interferência das MSCs na diferenciação dos linfócitos T CD4+ *naïve* em linfócitos Th1 efetores, provocando uma alteração no balanço dos linfócitos Th1/Th2, conduzindo a uma maior produção de IL-4 e indução de um fenótipo mais anti-inflamatório [50]. Além disso, as MSC induzem a expansão de linfócitos T reguladores, que são células especializadas na supressão da ativação do sistema imune mantendo a homeostase. Recentemente, observou-se que as MSCs impediram a diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4+ *naïve* em linfócitos Th17 e inibiram linfócitos Th17 totalmente diferenciados de produzirem IL-17, IL-22, IFN- γ e TNF- α [55]. Vários grupos de pesquisa demonstraram que as MSCs também são capazes de inibir a indução da citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos [56,57]. Contudo, não foi observado um efeito inibidor das MSCs sobre os linfócitos T citotóxicos ativados. De forma a comparar as ações imunomoduladoras *in vitro* das MSCs da matriz do cordão umbilical, tecido adiposo e medula óssea, um estudo recente evidenciou diferentes capacidades de supressão sobre os linfócitos T [39]. As MSCs derivadas das três fontes de isolamento revelaram capacidade de prevenir a ativação de linfócitos T citotóxicos e auxiliares e a aquisição de características

morfológicas típicas de linfoblastos. Contudo, as MSCs derivadas do tecido adiposo mostraram um maior efeito inibitório e as células derivadas da matriz do cordão umbilical um efeito mais brando [39].

As MSCs também podem regular a resposta imunitária através da interação com os linfócitos B. A co-cultura de MSCs e linfócitos B, com estímulos para ativação destes, demonstrou que as MSCs inibiram a proliferação dos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) [58]. No entanto, dependendo do nível de estimulação, a secreção de IgG pelos linfócitos B ativados pode ser estimulada ou inibida após a adição de MSC [59].

A imunidade inata também é afetada pela ação imunoreguladora das MSCs. Algumas destas ações passam pela inibição da maturação *in vitro* de monócitos e inibição da diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas em células dendríticas, bem como pela regulação da expressão de moléculas de MHC de classe II na superfície de células dendríticas maduras [60,61]. Estes efeitos, juntamente com a capacidade das MSCs para diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 e o TNF- α , e aumentar a produção de IL-10 pelos monócitos e células dendríticas, sugere que as MSCs têm a capacidade de interferir tanto na função de apresentação do antígeno, bem como no potencial pro-inflamatório das APCs [60,62]. As MSCs podem ainda inibir a citotoxicidade das células *natural killer* através da inibição da sua proliferação e da sua produção de IFN- γ [63,64]. Em relação aos neutrófilos, as MSCs podem suprimir a produção *in vitro* de peróxido de hidrogénio em neutrófilos ativados, sugerindo uma limitação da intensidade da explosão oxidativa após a estimulação inflamatória [65].

Este conjunto de resultados indicam que as MSCs podem regular negativamente a intensidade de uma resposta imunitária, afetando tanto a imunidade inata e como a adaptativa. Contudo, é importante notar que a maioria dos resultados descritos se referem a condições testadas *in vitro*, enquanto o efeito imunoregulador das MSCs que ocorre *in vivo* e de forma natural permanece desconhecido.

1.2.4. Mecanismos da imunomodulação das MSCs

Embora exista um grande número de estudos que evidenciam a ação imunossupressora das MSCs, os mecanismos subjacentes a esta ação imunomodulatória apenas são compreendidos parcialmente e, por vezes, alguns trabalhos publicados até apresentam alguns dados contraditórios [revisto em 66]. Resultados recorrentes sugerem que pelo menos algumas funções imunomoduladoras das MSCs não são expressas constitutivamente, mas são induzidas pela citocina pró-inflamatória IFN- γ , sozinha ou concomitante com TNF- α , IL-1 α , ou IL-1 β , secretados por linfócitos ativados [67–69]. Por sua vez, estas citocinas induzem as MSCs a produzir vários fatores solúveis que medeiam a sua atividade imunossupressora. Como as MSC mostraram ter a capacidade de suprimir a produção de IFN- γ nos linfócitos, foi sugerido um modelo de mecanismo *feedback*: os linfócitos ativados produzem IFN- γ que ativa a função imunossupressora das MSCs, que por sua vez irá suprimir a produção de IFN- γ pelos linfócitos como forma de regulação do processo (**Figura 4**) [66–69].

Os fatores solúveis que têm sido sugeridos como tendo um papel ativo nas funções imunossupressoras das MSCs, podem ser secretados por estas células ou por leucócitos. Vários estudos demonstram que a IL-10 pode ser produzida por várias células do sistema imune inato e adaptativo, bem como pelas MSCs [49,69–71]. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, envolvida em muitos processos imunossupressores e, por conseguinte, desempenha um papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes [70]. A neutralização da IL-10, numa co-cultura de MSCs e de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) ativadas utilizando anticorpos específicos, resultou na anulação do efeito inibidor da proliferação exercido pelas MSCs [49,72]. Este resultado demonstra que a IL-10 desempenha um papel importante no mecanismo de supressão mediado pelas MSCs. A IL-6, para além de ser produzida pelas células do sistema imune, também o pode ser pelas MSCs. Esta interleucina tem sido associada à proteção dos linfócitos e dos neutrófilos de sofrerem apoptose, bem como à inibição mediada pelas MSCs da diferenciação de monócitos em células dendríticas [60,65,73].

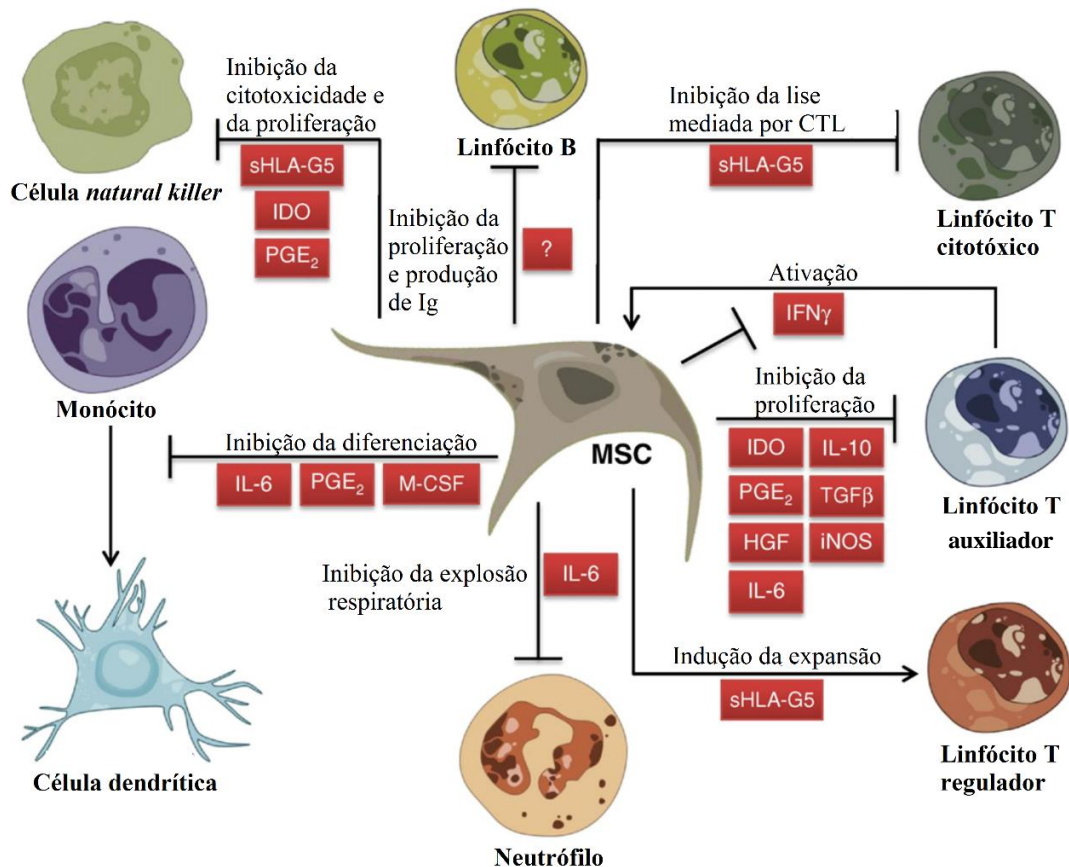


Figura 4- Possível mecanismo dos efeitos imunomodulatórios das MSCs nas células do sistema imune. Os vários fatores solúveis secretados pelas MSCs estão associados às suas propriedades imunomoduladoras sobre as células do sistema imune. Adaptado de Bem-Ami [66].

Outros fatores solúveis que têm sido estudados e correlacionados com a ação imunomoduladora das MSCs são o TGF- β e o HGF [32]. Estes dois fatores solúveis são secretados pelas MSCs e têm um efeito imunossupressor, inibindo a proliferação de linfócitos T [74]. Alguns resultados publicados recentemente evidenciam, ainda, que este efeito pode ser anulado na presença de elevadas concentrações de anticorpos neutralizadores para o TGF- β 1 e HGF [75]. No entanto, a neutralização de cada fator separadamente apenas resultou na recuperação parcial da proliferação dos linfócitos T, excluindo assim o papel individual de um só fator na ação imunossupressora induzida pelas MSCs [75].

Um outro mecanismo que tem sido investigado é a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas MSCs estimuladas com IFN- γ [76]. A IDO é uma enzima que catalisa a conversão de triptofano em quinurenina. Uma vez que o triptofano é necessário

para a proliferação dos linfócitos, a IDO tem um efeito supressor sobre a proliferação dos linfócitos T e a adição de triptofano em co-culturas com MSCs pode restaurar essa proliferação. No entanto, outro estudo excluiu um papel imunossupressor para a IDO, uma vez que a adição de triptofano ou de um inibidor da IDO não mostrou ter efeito sobre a supressão mediada pelas MSCs [77].

As MSCs expressam constitutivamente ambas as ciclooxygenases, COX-1 e COX-2, e tem-se observado um aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2) em condições de co-cultura de MSCs e linfócitos T [78–80]. Além disso, a proliferação de linfócitos T estimulados pode ser restaurada com a adição de inibidores da síntese de PGE2. Por outro lado, a adição de um inibidor de PGE2 restaurou a diferenciação e função das células dendríticas, que tinha sido inibida pelas MSCs. Já a adição direta de PGE2 a culturas de monócitos bloqueou a sua diferenciação em células dendríticas de uma forma semelhante à inibição induzida pelas MSCs, o que sugere um papel importante para esta prostaglandina na imunossupressão mediada pelas MSCs [81].

Outra molécula solúvel importante envolvida na regulação imune das MSCs é o HLA-G5 [82]. A isoforma solúvel de HLA-G5, produzida pelas MSCs após o contacto célula-a-célula com linfócitos T estimulados, é responsável pela supressão da proliferação de linfócitos T e da citólise e produção de IFN- γ mediada por células *natural killer* e pela expansão de linfócitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+ [82].

Resultados recentes demonstram que a inibição da sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS) foi suficiente para restabelecer a proliferação dos linfócitos T em co-culturas de MSCs e esplenócitos ativados com anti-CD3 [68]. Estes resultados mostram que o óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante na supressão imunológica mediada pelas MSCs. O IFN- γ induz a função imunossupressora das MSCs, promovendo a expressão de várias quimiocinas e iNOS. Estas quimiocinas dirigem a migração de linfócitos T para as vizinhanças das MSCs, onde a capacidade de resposta dos linfócitos T é suprimida [68].

Embora vários mediadores tenham sido identificados, o(s) mecanismo(s) exato(s) pelo(s) qual(ais) todas estas moléculas interagem e exercem a atividade supressora mediada pelas MSCs está apenas parcialmente compreendido [32]. Além disso, a neutralização de uma destas moléculas individualmente não tem resultado numa anulação completa da imunorregulação das MSCs, pelo que cada um destes fatores solúveis parecem desempenhar apenas um papel parcial neste complexo mecanismo. Outra questão que carece de respostas

é se este mecanismo é baseado exclusivamente na ação dos fatores solúveis ou alternadamente requer o contato direto célula-a-célula entre as MSCs e os leucócitos [66].

A imunossupressão por contato direto célula-a-célula tem sido pouco investigado, em relação à ação dos fatores solúveis produzidos pelas MSCs. Estudos em que foram usados sistemas *transwell* mostraram que o contato célula-a-célula é necessário, uma vez que os efeitos mediados pelas MSCs foram diminuídos ou suprimidos quando as células-alvo e células efectoras estavam separadas por uma membrana [44]. Por outro lado, Tse *et al* verificou que a proximidade às MSCs era importante na supressão da resposta dos linfócitos T, tendo sugerido que o contato direto entre as células era mais importante do que os fatores solúveis na função imunossupressora mediada pelas MSCs [77].

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da ação imunomoduladora das MSCs da matriz do cordão umbilical em diferentes subpopulações de linfócitos T do sangue periférico, do baço e do gânglio linfático.

Para este efeito procedeu-se à:

- Caracterização imunofenotípica das diferentes subpopulações de linfócitos T: Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ e sua distribuição nos compartimentos *naïve*, memória e efetor; dos linfócitos B e das células NK, nas amostras de sangue periférico e nas biópsias de baço e de gânglio;

Em culturas celulares de células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas:

- Caracterização funcional das subpopulações de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ através da produção das citocinas intracelulares TNF- α , IL-17, IFN- γ , IL-9, IL-2 e IL-10;
- Análise da expressão génica, após *cell sorting*, de IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos Th e Tc, de perforina em T $\gamma\delta$ e de IDO em MSCs.

3. Material e métodos

3.1. Isolamento e cultura de MSCs a partir da matriz do cordão umbilical

O isolamento e cultura de MSCs a partir da matriz do cordão umbilical foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular do Centro de Neurociências e Biologia Celular (UC-Biotech). Todos os procedimentos relativos à manipulação do cordão umbilical e cultura das MSCs foram realizados sob condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar vertical classe II (HeraSafe HS-18, Heraeus, Germany).

Os cordões umbilicais humanos foram obtidos após o nascimento de doadores saudáveis e fornecidos pela Crioestaminal S.A.. Antes do processamento dos tecidos, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente em tubos cónicos estéreis de 50 mL (VWR International, U.S.A.) durante 12 a 48h [83]. Cada unidade de cordão umbilical foi cortada em secções de 5 cm de comprimento e lavada 2 ou 3 vezes para remoção do sangue com tampão fosfato-salino estéril (PBS, Life Technologies, U.S.A.). A veia e artérias umbilicais foram removidas e a matriz do cordão foi cortada em fragmentos de 2-5 mm com ajuda de bisturi e pinça. Posteriormente, grupos de 15 a 30 fragmentos foram transferidos para placas de cultura de 21 cm² e deixados a secar por 30 minutos para promover a aderência dos fragmentos à placa. O meio de proliferação de MSC [Alpha-MEM] (Life Technologies, U.S.A.) suplementado com 10% volume/volume (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS, Hyclone, U.S.A.), 10 U/mL Penicilina (Life Technologies, U.S.A.), 10 µg/mL de Estreptomicina (Life Technologies, U.S.A.) e 2,5 µg/mL de Anfotericina B (Life Technologies, U.S.A.), pré-aquecido em banho de água a 37°C, foi adicionado lentamente aos fragmentos aderidos à placa até todos os fragmentos estarem imersos. Estes fragmentos foram mantidos em cultura por 15-20 dias, numa incubadora com ambiente assético a 37°C e com 5% de CO₂ e atmosfera humedecida, até as MSCs migrarem para fora dos fragmentos e formarem colónias bem definidas. Ao longo destes 15-20 dias, sempre que necessário foi adicionado regularmente o volume de meio para que os fragmentos se mantivessem imersos. Após remoção dos fragmentos e lavagem das células que migraram para fora dos mesmos com PBS, estas células foram destacadas da superfície da placa de cultura usando solução de Tripsina (500 µg/mL) – EDTA (200 µg/mL) (Life Technologies, U.S.A.) durante 5 minutos, a 37°C. A Tripsina foi inativada com meio Alpha-MEM com 10% (v/v) de FBS (Life

Tecnologies, U.S.A.) e as células foram ressuspensas usando um pipeta serológica de 5 mL (Corning-costar, U.S.A.) para dissociação completa das células. De seguida, as células foram centrifugadas (290 g durante 5 minutos), o sobrenadante foi decantado e o *pellet* foi ressuspenso em meio de proliferação de MSCs usando uma pipeta serológica. As células foram contadas e plaqueadas em novas placas de cultura de 21 cm². Para o procedimento de passagem, as células foram lavadas duas vezes com PBS e destacadas com solução de Tripsina-EDTA (como descrito acima) quando atingem uma confluência de 70-80%. As células foram passadas até um máximo de 5 passagens (P5).

3.1.1. Criopreservação de MSCs

Quando uma confluência de 80-90% foi atingida, as MSCs foram dissociadas utilizando uma solução de Tripsina-EDTA, em seguida ressuspensas com meio de proliferação de MSCs e recolhidas para um tubo cónico para centrifugação (290 g, 5 min). O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio de congelação, constituído por FBS (Life Technologies, U.S.A.) com 10% (v/v) de DMSO para cultura celular (Sigma, U.S.A.), e transferido para um tubo de criopreservação (Nunc). O tubo foi congelado a -80°C durante a noite num crio-refrigerador à base de isopropanol (VWR, U.S.A.), para promover um congelamento progressivo (-1°C/min). Em seguida, o tubo foi transferido para um reservatório de azoto líquido, corretamente identificado com o tipo de células, número de passagem, tipo de substrato e data de congelamento.

3.2. Isolamento de células mononucleares por gradiente de densidade

Este estudo envolveu 4 amostras de sangue periférico heparinizado de potenciais doadores cadáveres de órgãos ou tecidos para transplante e suas respectivas biópsias de baço e gânglio linfático (todos do sexo feminino com uma média de idades de 62,5±10,2 anos). Todos os procedimentos relativos à manipulação de células mononucleares (MNCs) foram realizados sob condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar vertical classe II (Labculture Class II BSC, ESCO).

As amostras de sangue periférico heparinizado foram diluídas em soro fisiológico (1:2) e posteriormente colocados lentamente 10 mL sobre 8 mL de Lymphoprep (Axis-Shield, Scotland) em tubos de vidro de fundo redondo, de forma a evitar a mistura dos dois líquidos. Em relação à biópsia de gânglio, este foi picado com recurso a uma seringa e posteriormente injetado meio RPMI-1640 (Gibco, U.K.), resultando uma suspensão celular com células do gânglio linfático. 10 mL dessa suspensão celular foram colocados lentamente sobre 8 mL de Lymphoprep (Axis-Shield, Scotland) em tubos de vidro de fundo redondo. As amostras de baço foram cortadas em pequenos fragmentos com ajuda de pinça e bisturi e transferidos para um copo de vidro com soro fisiológico. Os fragmentos ficaram imersos por uma hora para promover a difusão das células para o soro. Posteriormente, foram colocados lentamente 10 mL dessa suspensão celular sobre 8 mL de Lymphoprep (Axis-Shield, Scotland) em tubos de vidro de fundo redondo.

Os tubos de vidro contendo Lymphoprep e suspensão celular foram centrifugados durante 20 minutos a 2500 rpm, a 20°C. O anel das células mononucleares, situado entre o Lymphoprep e o plasma, foi recolhido com uma pipeta de Pasteur, para um tubo de Falcon de 50ml (BD Biosciences, U.S.A.). De seguida realizou-se uma lavagem da suspensão celular com RPMI-1640 com 0.1% de antibiótico antimicótico (Gibco, U.K.), centrifugando-se esta mistura durante 15 minutos a 1600 rpm, a 20°C. O sobrenadante foi descartado, e efetuou-se nova lavagem com RPMI-1640 contendo 0.1% antibiótico antimicótico (Gibco, U.K.), centrifugando-se durante 10 minutos a 1300 rpm, a 20°C. Depois do sobrenadante ser decantado, adicionou-se ao *pellet* 1 mL de RPMI-1640 contendo 0.1% antibiótico antimicótico (Gibco, U.K.) e procedeu-se à contagem do número de células mononucleares num contador hematológico (Coulter Ac-T diff2, Beckman Coulter, U.S.A.).

3.3. Caraterização imunofenotípica das populações e subpopulações de linfócitos das amostras de sangue periférico e das biópsias de baço e gânglio

Após o isolamento e contagem de MNCs de sangue periférico, baço e gânglio linfático, 1×10^6 células mononucleares em meio RPMI-1640 (Gibco, U.K.) foram transferidas para tubos de citometria e seguiu-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Com uma pipeta de Pasteur foi removido o sobrenadante e de seguida foram adicionados os anticorpos

monoclonais para a caracterização das populações de linfócitos. O painel de marcadores escolhidos foi: CD3, CD4, CD8, CD45, CD56, CD19, CD27 e CD45Ra (**Tabela 2**), que permitiu quantificar e caracterizar: as diferentes subpopulações de linfócitos T (Th, Tc, T γ δ e TCD4+CD8+) e a sua distribuição nos compartimentos *naïve*, memória e efetor; os linfócitos B e as células NK.

Após a adição dos anticorpos monoclonais, os tubos foram incubados no escuro durante 15 minutos, foi adicionado 1 mL de solução FACS Lysing 1x (BD Biosciences, U.S.A.) e incubados novamente no escuro durante 15 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos, uma lavagem com 1 mL de PBS 1x (Gibco, U.K.) e novamente uma centrifugação. Após a decantação do sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 250 μ l de PBS 1x (Gibco, U.K.) e adquiridas no citómetro de fluxo.

Tabela 2- Painéis de anticorpos monoclonais para caracterização imunofenotípica e separação celular. Combinações de reagentes com seus respectivos clones e marcas.

		Fluorocrómo*							
		PB	KO	FITC	PE	PECy5 ou PerCP Cy5.5	PECy7	APC	APCH7
Caraterização das populações de linfócitos		CD8 RPA-T8 BD Pharmingen USA	CD45 J.33 Beckman Coulter USA	CD45Ra HI100 BD Pharmingen USA	CD56 N901 Beckman Coulter USA	CD27 1A4- CD27 Beckman Coulter USA	CD19 J3-119 Beckman Coulter USA	CD4 13B8.2 Beckman Coulter USA	CD3 SK7 BD Biosciences USA
Caraterização de subpopulações de linfócitos T e avaliação	TNF- α /IL-17	CD8 RPA-T8 BD Pharmingen USA	CD45 J.33 Beckman Coulter USA	cyTNF- α Mab11 BD Pharmingen USA	cyIL-17 SCPL1362 BD Pharmingen USA	-	CD56 N901 Beckman Coulter USA	CD4 13B8.2 Beckman Coulter USA	CD3 SK7 BD Biosciences USA

	IFN-γ/IL-9	CD8 RPA-T8 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	CD45 J.33 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	cyIFN- γ 4S.B3 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	cyIL-9 MH9A3 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	-	CD56 N901 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD4 13B8.2 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD3 SK7 <i>BD</i> <i>Biosciences</i> <i>USA</i>
	IL-2/IL-10	CD8 RPA-T8 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	CD45 J.33 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	cyIL-2 MQ-17H2 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	cyIL-10 JES3-19F1 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	-	CD56 N901 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD4 13B8.2 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD3 SK7 <i>BD</i> <i>Biosciences</i> <i>USA</i>
Separação Celular		CD8 RPA-T8 <i>BD</i> <i>Pharmingen</i> <i>USA</i>	CD45 J.33 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD49e SAM1 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	TCR $\gamma\delta$ IMMU510 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	-	CD56 N901 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD4 13B8.2 <i>Beckman</i> <i>Coulter</i> <i>USA</i>	CD3 SK7 <i>BD</i> <i>Biosciences</i> <i>USA</i>

*APC, allophycocyanin; APCH7; allophycocyanin-hilite 7; FITC, fluorescein isothiocyanate; KO, khrome orange; PB, pacific blue; PE, phycoerythrin; PEC γ 5, phycoerythrin-cyanine 5; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5; PEC γ 7, phycoerythrin-cyanine 7.

3.4. Co-cultura de MSCs derivadas da matriz do cordão umbilical com MNCs de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio

As co-culturas foram executadas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Switzerland) com as MNCs isoladas e as MSCs da matriz do cordão umbilical em RPMI-1640 contendo 0.1% antibiótico antimicótico (Gibco, U.K.). Para a caracterização imunofenotípica das subpopulações de linfócitos T e avaliação da produção de citocinas foram realizadas diferentes condições: 1×10^6 MNCs de sangue periférico em 1ml de meio RPMI-1640; 1×10^6 MNCs de sangue periférico e 5×10^5 MSCs em 1ml de meio RPMI-1640; 1×10^6 MNCs de baço em 1ml de meio RPMI-1640; 1×10^6 MNCs de baço e 5×10^5 MSCs em 1ml de meio RPMI-1640; 1×10^6 MNCs de gânglio linfático em 1ml de meio RPMI-1640; 1×10^6 MNCs de gânglio linfático e 5×10^5 MSCs em 1ml de meio RPMI-1640. As placas foram mantidas

em cultura durante 24 horas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂. Após a incubação, as culturas foram ativadas durante 4 horas, pela adição de 50ng/ml de PMA (Sigma, U.S.A.), 1µg/ml de ionomicina (Sigma, v) e de 10µg/ml brefeldina A (Sigma, U.S.A.), e mantidas no mesmo ambiente.

Também foram realizadas diferentes condições para a separação celular: 1x10⁶ MNCs de sangue periférico em 1ml de meio RPMI-1640; 1x10⁶ MNCs de sangue periférico e 5x10⁵ MSCs em 1ml de meio RPMI-1640; 1x10⁶ MNCs de baço em 1ml de meio RPMI-1640; 1x10⁶ MNCs de baço e 5x10⁵ MSCs em 1ml de meio RPMI-1640; 1x10⁶ MNCs de gânglio linfático em 1ml de meio RPMI-1640; 1x10⁶ MNCs de gânglio linfático e 5x10⁵ MSCs em 1ml de meio RPMI-1640; 5x10⁵ MSCs em 1ml de meio RPMI-1640. As placas foram mantidas em cultura durante 24 horas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂. Após a incubação, as culturas foram ativadas durante 4 horas, pela adição de 50ng/ml de PMA (Sigma, U.S.A.) e de 1µg/ml de ionomicina (Sigma, U.S.A.), e mantidas no mesmo ambiente.

3.5. Caracterização funcional das subpopulações de linfócitos T através da produção de citocinas intracelulares

Após a incubação e ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 hora das coculturas de células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, o conteúdo de cada poço das diferentes condições experimentais foi transferido para tubos de citometria seguindo-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Com uma pipeta de Pasteur foi removido o sobrenadante e de seguida foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfície para a caracterização das subpopulações de linfócitos. O painel de marcadores de superfície escolhido foi: CD3, CD4, CD8, CD45 e CD56 (**Tabela 2**). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro, 100 µL de solução de fixação (*kit* Intraprep, Beckman Coulter U.S.A.) foi adicionada para mais 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de PBS e após centrifugação durante 5 minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi decantado. Às células foi adicionado 100µL de solução de permeabilização (*kit* Intraprep, Beckman Coulter, U.S.A.) seguido dos anticorpos

monoclonais intracelulares. O painel de citocinas intracelulares escolhidas foi: TNF- α e IL-17, IFN γ e IL-9 ou IL-2 e IL-10 (**Tabela 2**). Após 15 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, as amostras foram lavadas com PBS (5 minutos a 1500 rpm). O *pellet* foi ressuspensão em 250 μ l de PBS e de seguida, as amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo.

3.6. Aquisição e análise por Citometria de Fluxo

As células foram adquiridas num citómetro de fluxo BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, USA), usando o *software* BD FACSDiva 6.1.2 (Becton Dickison; 2008). Para a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo recorreu-se ao *software* Infinicyt 1.8 (Cytognos, S.L., Salamanca, Espanha).

3.7. Separação e purificação das subpopulações de linfócitos T e das MSCs

Após a incubação e ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 hora das coculturas de células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, procedeu-se à separação celular. O conteúdo de cada poço das diferentes condições experimentais foi transferido para tubos de citometria seguindo-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Com uma pipeta de Pasteur foi removido o sobrenadante e de seguida foram adicionados os anticorpos monoclonais. O painel de marcadores escolhidos foi: CD3, CD4, CD8, CD45, CD56 e TCR $\gamma\delta$ (**Tabela 2**), que permitiu purificar as diferentes subpopulações de linfócitos T (Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+) e as MSCs. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS (Gibco, U.K.). A separação foi feita utilizando o separador celular FACSARIA II (BD Biosciences, U.S.A.). As populações celulares separadas foram transferidas para *ependorfs* de 1,5mL e centrifugadas durante 3 minutos a 3000rpm. O *pellet* foi ressuspensão em 350 μ L de tampão de lise RLT (Qiagen, Germany), para posteriormente se proceder ao congelamento das respetivas amostras a -20°C.

3.8. Análise da expressão gênica de linfócitos Th, Tc e T $\gamma\delta$ e MSCs

A extração de RNA total foi feita usando o RNeasy Micro Kit (Quiagen, Germany) de acordo com as instruções do fornecedor. Para a transcrição reversa do RNA extraído foi usado a iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante. De seguida foi feita a quantificação relativa da expressão gênica por PCR em tempo real pelo LightCycler 480 II (Roche Diagnostic, Rotkreuz, Switzerland). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando 1X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Germany), 1X QuantiTect Primer Assay (IL-10: QT00041685; IL-4: QT00012565; IL-5: QT00001435; PRF1: QT00199955; IDO: QT0000504) e 2 μ l de amostra de cDNA num volume total de 10 μ l. O perfil térmico foi o seguinte: 15min a 95°C, 50 ciclos de 15 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C e 30 seg. a 72°C e 1 ciclo de 30 seg. a 37°C. Os resultados do PCR em tempo real foram analisados com o *software* LightCycler (Roche Diagnostics).

Foram utilizados os genes de referência GAPDH e CYC1 para os linfócitos T e CYC1 e SF3A1 para as MSCs. Estes genes de referência e os seus fatores de normalização foram obtidos através do *software* geNorm (PrimerDesign Ltd., England). Por fim a normalização dos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada pelo método delta-Ct:

$$\text{Quantidade relativa de expressão de mRNA} = \frac{2^{-(\text{Menor } C_p - C_p \text{ amostra})}}{\text{Fator de normalização}}$$

3.9. Análise estatística

Para a análise estatística realizou-se os testes paramétricos *t-student* bicaudal de amostras emparelhadas, análise de variância ANOVA fator único e teste de Tukey (ferramentas do *Microsoft Excel 2013* e *Statistical Package for Social Sciences*, version 23.0, USA). Os resultados foram expressos como percentagem da média \pm desvio padrão e as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p-value* < 0,05.

4. Resultados

4.1. Caracterização imunofenotípica das diferentes subpopulações de linfócitos T (Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+) e sua distribuição nos compartimentos *naïve*, memória e efetor; dos linfócitos B e das células NK, nas amostras de sangue periférico e nas biópsias de baço e de gânglio

Após o isolamento por gradiente de densidade das células mononucleares de sangue periférico, baço e gânglio linfático, estes três ambientes imunológicos foram caracterizados imunofenotipicamente por citometria de fluxo (**Tabela 3**). Quantificou-se a percentagem de linfócitos B (CD19+CD3-), linfócitos T (CD3+CD19-CD56-) e células NK (CD56+CD3-CD19-) na celularidade total. Na população de linfócitos T foram quantificadas as suas subpopulações de linfócitos Th (CD3+CD4+CD8-), linfócitos Tc (CD3+CD8+CD4-), linfócitos T $\gamma\delta$ (CD3+CD4-CD8-) e linfócitos TCD4+CD8+ (CD3+CD4+CD8+), bem como a sua distribuição nos compartimentos *naïve* (CD45RA+CD27+), memória central (MC) (CD45RA-CD27+), memória efetora (ME) (CD45RA-CD27-) e efetor (CD45RA+CD27-).

A quantificação das percentagens de linfócito B e T e células NK na celularidade total mostrou que os linfócitos B são a população maioritária no baço e no gânglio enquanto no SP são os linfócitos T (**Tabela 3**). A percentagem de linfócitos B no SP é significativamente inferior à percentagem no baço e no gânglio. Nestes dois últimos ambientes, as percentagens destas células são semelhantes, uma vez que não se observou diferença estatística. Em relação aos linfócitos T, a sua percentagem no SP é significativamente inferior à do gânglio. No baço e no gânglio, as percentagens destas células são semelhantes, uma vez que também não apresentaram significado estatístico. Quanto às células NK, verificou-se uma tendência para uma maior percentagem no baço do que no SP e no gânglio, contudo esta diferença não é estatisticamente significativa (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Média das percentagens, desvio padrão e significância estatística das diferentes populações de células mononucleares de SP, baço e gânglio.

% Células	SP (n=4)	Baço (n=4)	Gânglio (n=4)	Teste ANOVA (<i>p</i> -value <0,050)	Teste Tukey (<i>p</i> -value <0,050)
Linfócitos B	4,1±2,7	55,0±10,2	58,4±15,0	0,001	0,003 (SP vs. baço) 0,020 (SP vs. gânglio)
Células NK	2,9±3,6	5,9±1,7	1,5±1,1	0,153	-
Linfócitos T	5,2±7,5	24,8±12,5	38,4±15,1	0,041	0,035 (SP vs. gânglio)
Linfócitos Th	63,3±18,5	68,0±25,5	81,1±10,9	0,436	-
Linfócitos Th <i>Naïve</i>	25,8±35,1	28,3±34,3	34,7±32,2	0,930	-
Linfócitos Th MC	52,7±24,6	50,2±29,2	52,3±25,2	0,990	-
Linfócitos Th ME	18,9±11,9	17,2±21,8	12,2±13,8	0,835	-
Linfócitos Th Efetor	2,6±2,8	4,3±6,4	0,8±1,3	0,529	-
Linfócitos Tc	30,9±19,2	29,7±25,9	17,4±11,3	0,580	-
Linfócitos Tc <i>Naïve</i>	31,7±12,6	18,3±10,5	30,3±13,6	0,286	-
Linfócitos Tc MC	31,0±7,8	27,4±8,8	46,6±12,8	0,053	-
Linfócitos Tc ME	16,8±12,9	19,7±9,1	19,1±15,4	0,941	-
Linfócitos Tc Efetor	20,5±3,9	34,6±12,6	3,9±1,8	0,001	0,033 (SP vs. gânglio) 0,001 (baço vs. gânglio)
Linfócitos Tγδ	2,2±2,1	1,4±0,5	0,6±0,2	0,240	-
Linfócitos Tγδ <i>Naïve</i>	16,8±22,5	16,1±14,5	16,3±11,7	0,998	-
Linfócitos Tγδ MC	28,3±15,8	44,6±21,7	51,8±18,6	0,251	-
Linfócitos Tγδ ME	25,5±22,4	17,5±12,8	27,2±21,8	0,759	-
Linfócitos Tγδ Efetor	21,2±18,7	21,7±20,8	4,6±1,5	0,286	-
Linfócitos T CD4+CD8+	0,5±0,3	0,4±0,1	0,3±0,2	0,354	-
Linfócitos T CD4+CD8+ <i>Naïve</i>	17,5±14,5	15,2±16,4	23,8±20,9	0,780	-
Linfócitos T CD4+CD8+ MC	33,6±30,2	51,0±19,6	56,6±8,6	0,330	-
Linfócitos T CD4+CD8+ ME	33,1±31,9	25,6±27,8	18,4±21,4	0,756	-
Linfócitos T CD4+CD8+ Efetor	15,8±13,2	8,2±8,1	1,3±1,9	0,130	-

Após a identificação da população de linfócitos T, procedeu-se à quantificação da percentagem de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ (**Tabela 3**). As percentagens destas subpopulações de linfócitos T não apresentaram diferenças com significado estatístico, quando comparadas entre os três ambientes imunológicos. Desta forma, os linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ apresentam um padrão similar no SP, no baço e no gânglio.

Quanto à distribuição dos linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ pelos seus compartimentos funcionais *naïve*, memória central (MC), memória efetora (ME) e efetor, verificou-se que estas subpopulações de linfócitos T apresentaram um padrão de distribuição semelhante no SP, no baço e no gânglio (**Tabela 3 e Figura 5**). Nos linfócitos Th, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ não se verificou diferenças com significado estatístico dos seus compartimentos funcionais entre os três ambientes imunológicos. Já os linfócitos Tc apresentaram diferenças significativas no compartimento das células efetoras, tendo-se verificado que os linfócitos Tc efetores do gânglio apresentaram uma percentagem inferior em relação ao SP e ao baço.

4.2. Caracterização funcional das subpopulações de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ através da produção das citocinas intracelulares na presença e ausência de MSCs

Células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio foram cultivadas na presença e na ausência de células mesenquimais da matriz do cordão umbilical. Após quatro horas de ativação *in vitro* com PMA e ionomicina foi realizada a caracterização funcional das subpopulações de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ através da produção das citocinas intracelulares TNF- α , IL-17, IFN- γ , IL-9, IL-2 e IL-10 (**Tabela 4**).

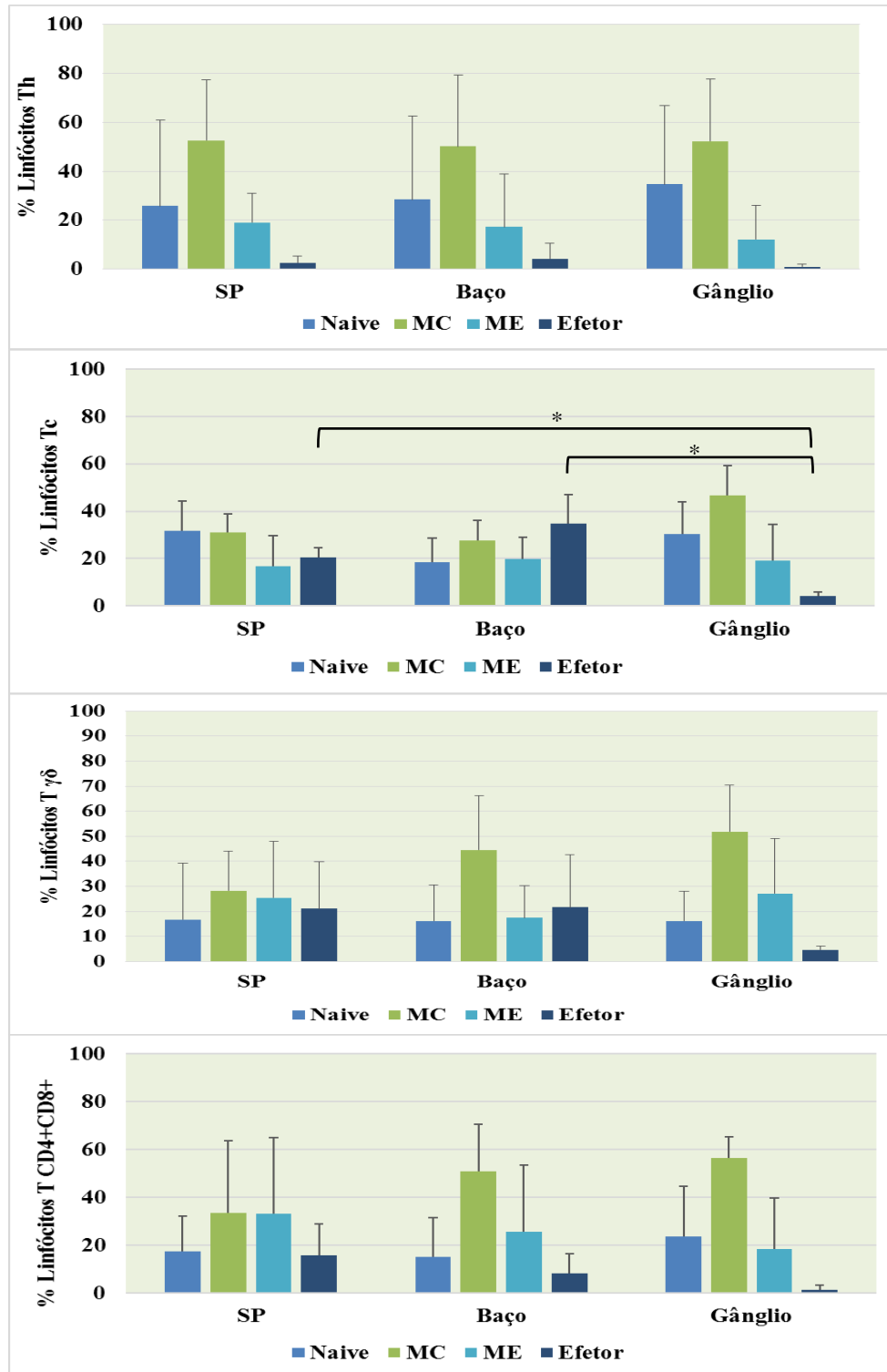


Figura 5- Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ nos seus compartimentos funcionais, de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio. Após o isolamento por gradiente de densidade das MNCs de SP, baço e gânglio linfático, foram quantificadas as subpopulações: linfócitos Th (CD3+CD4+CD8-), linfócitos Tc (CD3+CD8+CD4-), linfócitos T $\gamma\delta$ (CD3+CD4-CD8-) e linfócitos TCD4+CD8+, bem como a sua distribuição nos compartimentos *naive* (CD45RA+CD27+), memória central (MC) (CD45RA-CD27+), memória efetora (ME) (CD45RA-CD27-) e efetor (CD45RA+CD27-). As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* < 0,05 (*, teste Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/baço vs. gânglio).

Tabela 4 - Média das percentagens, desvio padrão e significância estatística das diferentes subpopulações analisadas após co-cultura de MNCs de SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina (*, significado estatístico quando *p*-value <0,05 pelo teste *t*-*student*: sem MSC vs. com MSC).

% Linfócitos		SP (n=4)		Baço (n=4)		Gânglio (n=4)	
		Sem MSC	Com MSC	Sem MSC	Com MSC	Sem MSC	Com MSC
Th1	TNF- α +	11,5 \pm 5,1	1,7 \pm 0,6*	12,2 \pm 6,5	0,8 \pm 0,5*	11,8 \pm 1,4	1,8 \pm 1,8*
	IFN- γ +	2,4 \pm 1,4	0,8 \pm 0,7*	1,7 \pm 0,8	0,4 \pm 0,3*	0,8 \pm 0,5	0,2 \pm 0,1*
	IL-2+	0,9 \pm 0,5	0,5 \pm 0,2	1,5 \pm 0,9	0,2 \pm 0,1	4,6 \pm 2,6	0,3 \pm 0,2
Tc1	TNF- α +	17,6 \pm 7,5	3,0 \pm 3,2*	15,7 \pm 8,4	1,4 \pm 0,8*	9,1 \pm 7,1	1,8 \pm 1,7*
	IFN- γ +	10,4 \pm 7,7	2,6 \pm 2,9*	7,5 \pm 8,0	1,9 \pm 3,0	6,1 \pm 3,7	1,6 \pm 0,9
	IL-2+	0,9 \pm 0,6	0,4 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2*	2,6 \pm 3,0	0,6 \pm 0,5
Th17 IL-17+		1,2 \pm 1,0	0,6 \pm 0,5	0,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1*	0,3 \pm 0,3	0,1 \pm 0,0
Th9 IL-9+		0,4 \pm 0,3	0,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,4	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0
Th IL-10+		0,7 \pm 0,8	0,9 \pm 0,9	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
T $\gamma\delta$	TNF- α +	10,5 \pm 3,4	2,3 \pm 1,0*	9,0 \pm 7,1	1,1 \pm 1,0	5,4 \pm 2,9	1,2 \pm 1,3*
	IFN- γ +	4,1 \pm 3,0	2,3 \pm 1,7	1,9 \pm 1,3	0,9 \pm 1,0	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1
T	TNF- α +	31,4 \pm 19,1	0,7 \pm 1,4*	13,4 \pm 3,6	1,3 \pm 0,7*	12,2 \pm 13,5	5,4 \pm 4,9
CD4+CD8+	IFN- γ +	9,6 \pm 1,7	3,3 \pm 3,9*	6,8 \pm 7,7	2,9 \pm 2,8	7,7 \pm 4,6	2,3 \pm 1,9

Para cada ambiente imunológico, nomeadamente SP, baço e gânglio linfático, foi calculada a percentagem de inibição da produção de citocinas intracelulares pelos linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ após co-cultura na presença de MSCs da matriz do cordão umbilical (**Tabela 5**). A percentagem de inibição foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\% \text{ linfócitos na ausência de MSC} - \% \text{ linfócitos na presença de MSC}}{\% \text{ linfócitos na ausência de MSC}}$$

Tabela 5- Média das percentagens de inibição, desvio padrão e significância estatística das diferentes subpopulações analisadas após co-cultura de MNCs de SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina.

% Inibição de linfócitos	SP (n=4)	Baço (n=4)	Gânglio (n=4)	Teste		
				ANOVA (<i>p</i> -value <0,050)	Teste <i>Tukey</i> (<i>p</i> -value <0,050)	
Th1	TNF- α +	83,2 \pm 7,0	88,2 \pm 15,8	85,2 \pm 14,4	0,866	-
	IFN- γ +	63,8 \pm 19,3	76,4 \pm 19,9	70,2 \pm 15,6	0,636	-
	IL-2+	40,4 \pm 8,8	78,9 \pm 22,1	94,3 \pm 3,4	0,008	0,033 (SP vs. baço) 0,007 (SP vs. gânglio)
Tc1	TNF- α +	84,4 \pm 12,1	82,1 \pm 25,5	82,4 \pm 6,8	0,978	-
	IFN- γ +	79,4 \pm 13,3	72,7 \pm 18,0	65,4 \pm 20,4	0,550	-
	IL-2+	54,1 \pm 20,7	67,9 \pm 19,2	64,6 \pm 43,2	0,843	-
Th17 IL-17+	55,3 \pm 28,0	40,5 \pm 7,5	49,0 \pm 28,2	0,749	-	
Th9 IL-9+	39,5 \pm 7,2	62,7 \pm 22,0	61,0 \pm 24,0	0,327	-	
T $\gamma\delta$	TNF- α +	78,7 \pm 2,6	90,8 \pm 4,8	76,7 \pm 19,9	0,399	-
	IFN- γ +	39,6 \pm 49,1	48,4 \pm 46,7	39,8 \pm 28,0	0,945	-
T CD4+CD8+	TNF- α +	97,6 \pm 3,4	89,6 \pm 9,6	67,1 \pm 8,9	0,061	-
	IFN- γ +	66,2 \pm 39,3	78,7 \pm 23,2	73,3 \pm 23,7	0,890	-

A presença das MSCs resultou numa diminuição significativa da percentagem de linfócitos Th1 produtores de TNF- α e IFN- γ no SP, no baço e no gânglio (**Tabela 4 e Figura 6**). Os linfócitos Th produtores de IL-2 também apresentaram uma diminuição nos três ambientes imunológicos, embora sem significado estatístico. Em relação à percentagem de inibição (**Tabela 5 e Figura 6**), verificou-se que o SP, o baço e o gânglio apresentaram um padrão de inibição semelhante para os linfócitos Th produtores de TNF- α e IFN- γ . Por outro lado, os linfócitos Th produtores de IL-2 do SP são menos sensíveis à presença das MSCs, uma vez que a sua percentagem de inibição é inferior à do baço e do gânglio, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

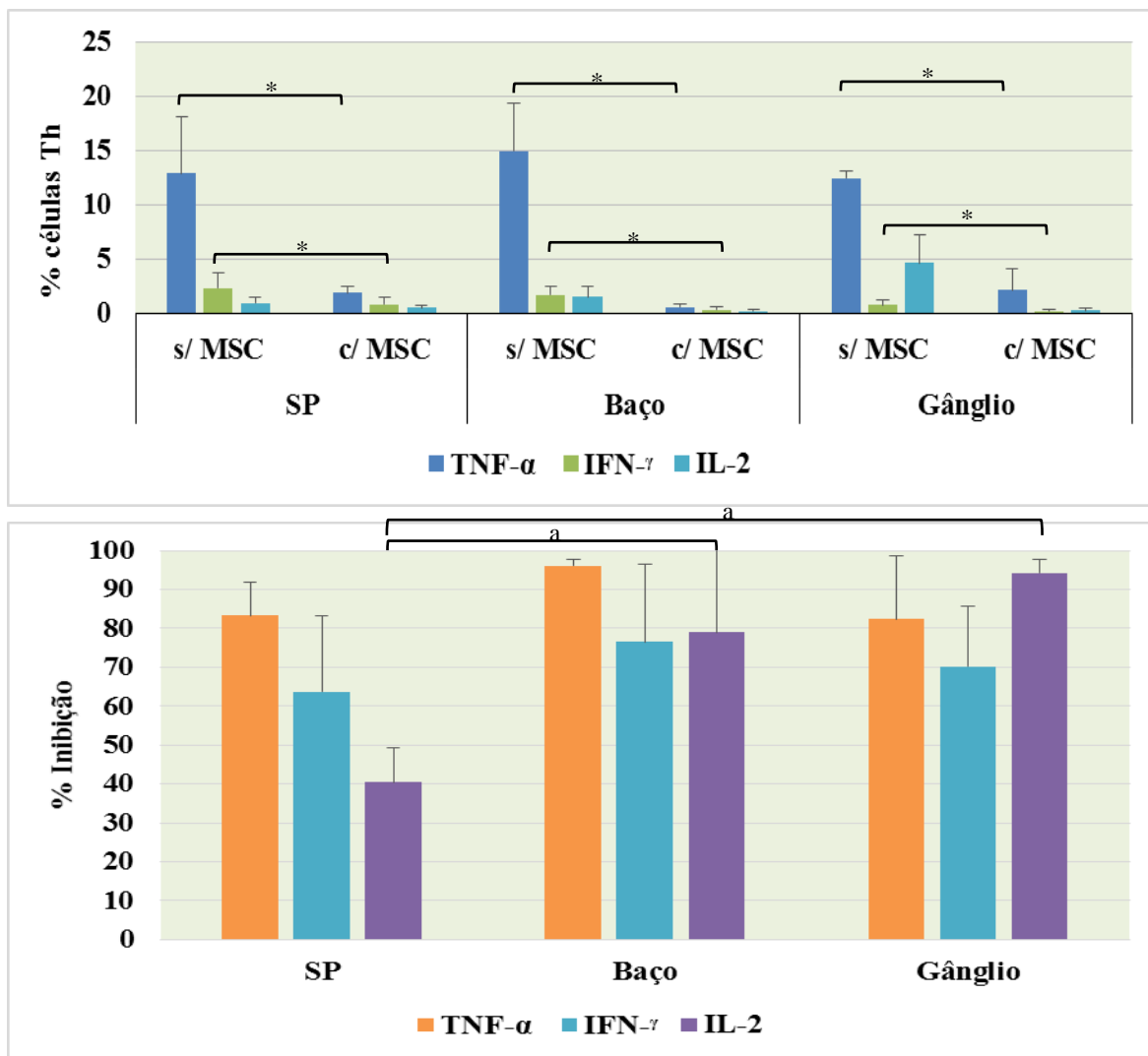


Figura 6- Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th1 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th TNF- α +, IFN- γ + e IL-2+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* <0,05 (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC; a, teste de *Tukey*: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).

A percentagem de linfócitos Tc1 produtores de TNF- α , IFN- γ e IL-2 no SP, no baço e no gânglio diminuiu com a presença das MSCs (Tabela 4 e Figura 7). A redução da percentagem de linfócitos Tc produtores de TNF- α apresentou significado estatístico nos três ambientes imunológicos, enquanto os linfócitos Tc produtores de IFN- γ e IL-2 apenas o apresentaram no SP e no baço, respetivamente. Quanto à percentagem de inibição (Tabela

5 e Figura 7), verificou-se que os três ambientes imunológicos apresentaram um padrão de inibição semelhante para os linfócitos Tc1.

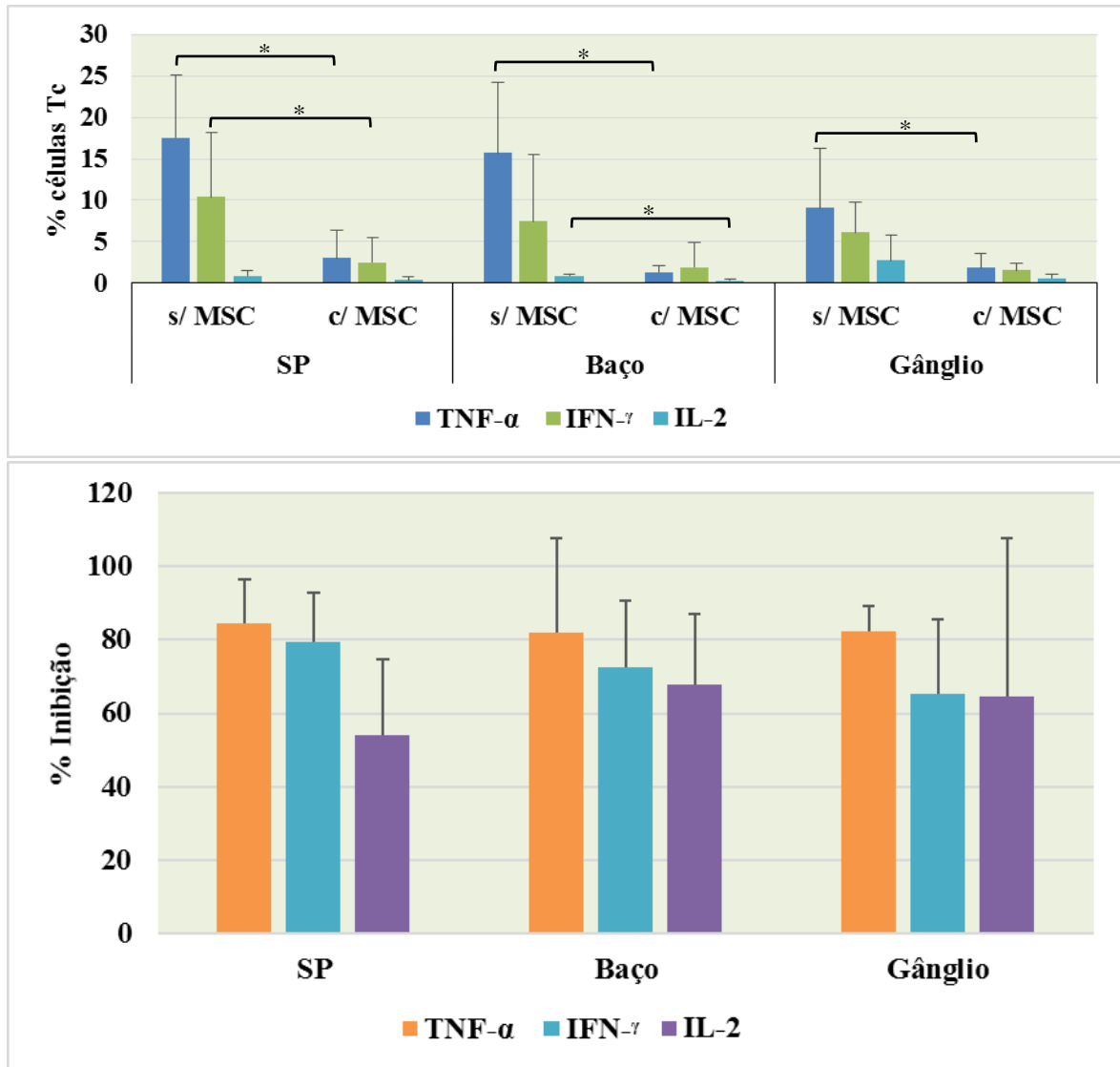


Figura 7- Representação gráfica da porcentagem de linfócitos Tc1 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua porcentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Tc TNF- α +, IFN- γ + e IL-2+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* < 0,05 (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC; a, teste de *Tukey*: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).

Nos linfócitos Th17 verificou-se uma redução com significado estatístico da porcentagem de linfócitos Th produtores de IL-17 no baço após adição de MSCs (Tabela 4 e Figura 8). No SP e no gânglio também se observou uma diminuição da porcentagem destas células, contudo sem significado estatístico. Quanto à porcentagem de inibição (Tabela 5 e Figura 8), verificou-se que os três ambientes imunológicos apresentaram um padrão de inibição semelhante para os linfócitos Th17.

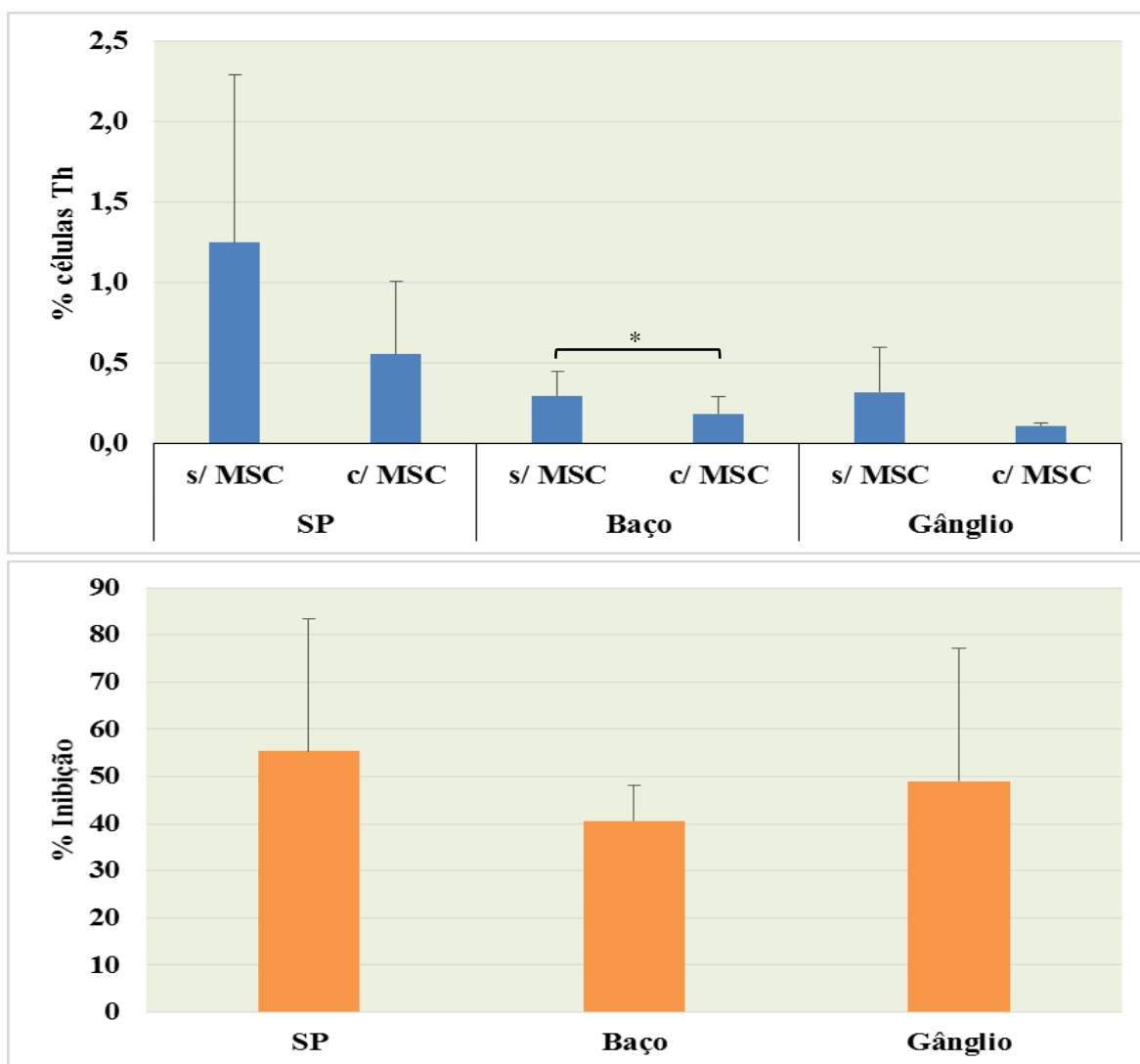


Figura 8- Representação gráfica da porcentagem de linfócitos Th17 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua porcentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th IL-17+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p -value $< 0,05$ (*, teste *t*-student: sem MSC vs. com MSC; a, teste de Tukey: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).

A presença das MSCs resultou numa diminuição na percentagem de linfócitos Th produtores de IL-9, tanto no SP como no baço e gânglio, sem significado estatístico (**Tabela 4 e Figura 9**). Uma vez que as percentagens de inibição dos linfócitos Th9 não apresentaram diferenças estatísticas entre os três ambientes imunológicos, o SP, baço e gânglio apresentaram um padrão de inibição semelhante para os linfócitos Th produtores de IL-9 (**Tabela 5 e Figura 9**).

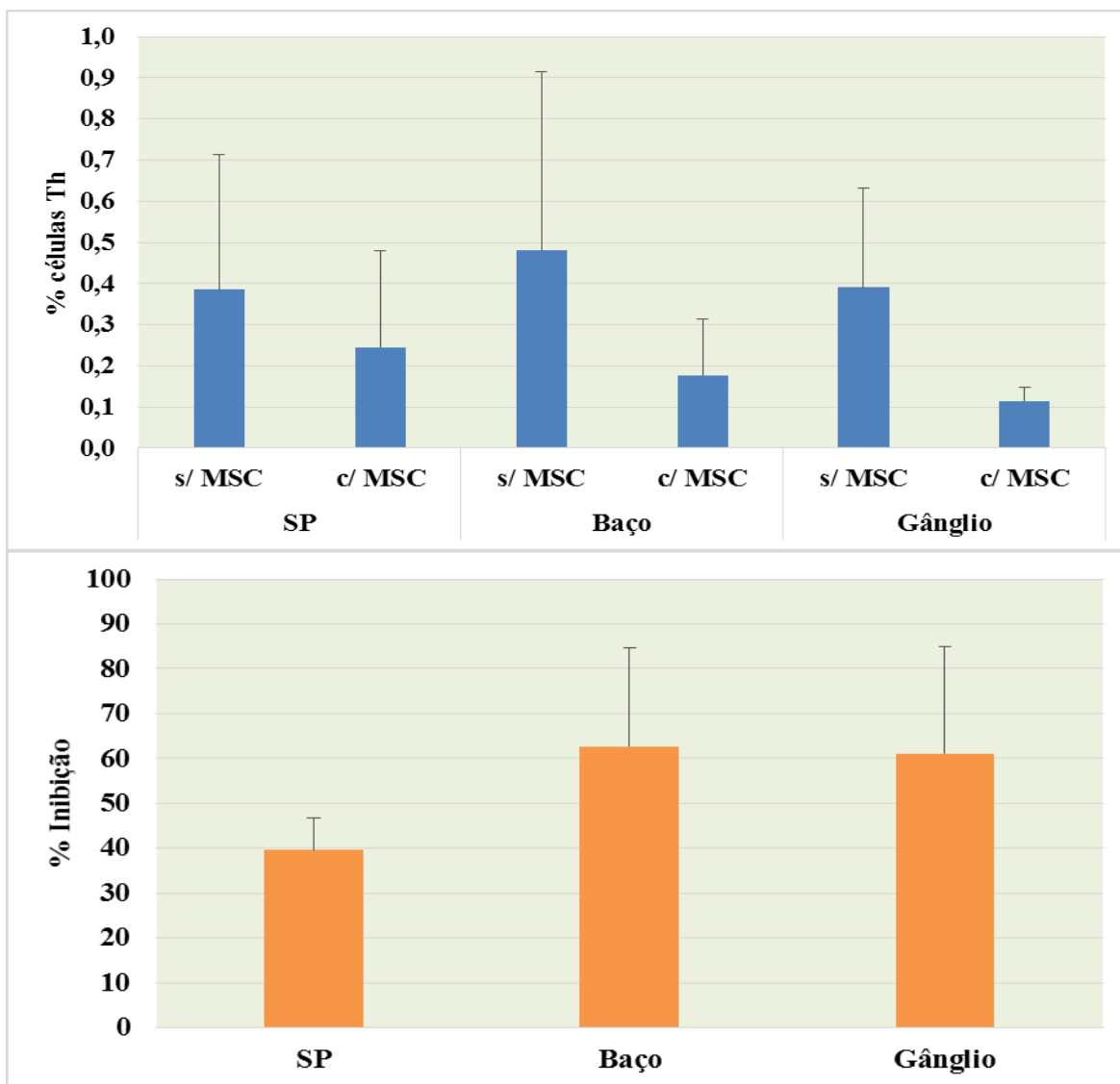


Figura 9- Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th9 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua percentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th IL-9+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando p -value $<0,05$ (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC; a, teste de *Tukey*: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).

A percentagem de linfócitos Th produtores de IL-10 no SP, no baço e no gânglio foi semelhante na ausência e presença das MSCs, não se observando uma inibição efetiva destas células nos três ambientes imunológicos (**Tabela 4 e Figura 10**).

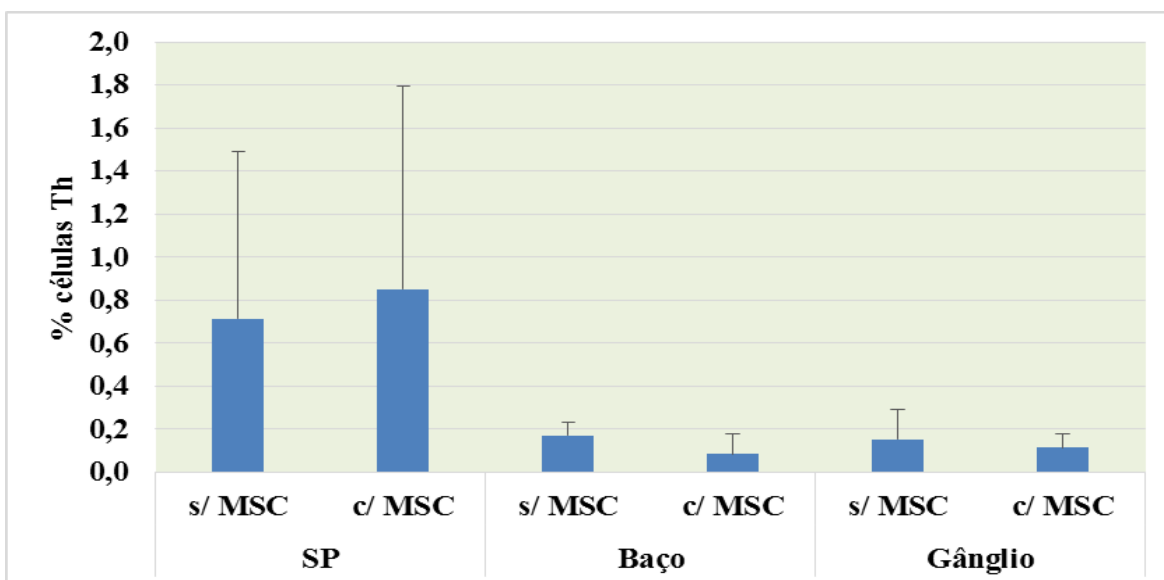


Figura 10- Representação gráfica da percentagem de linfócitos Th produtores de IL-10 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Th IL-10+. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando $p < 0,05$ (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC).

A percentagem de linfócitos $T\gamma\delta$ produtores de TNF- α e IFN- γ reduziu na presença das MSCs no SP, no baço e no gânglio (**Tabela 4 e Figura 11**). No SP e no gânglio, esta redução é estatisticamente significativa. Quanto à percentagem de inibição, verificou-se que os três ambientes imunológicos apresentaram um padrão de inibição semelhante para os linfócitos $T\gamma\delta$ produtores de TNF- α e IFN- γ (**Tabela 5 e Figura 11**).

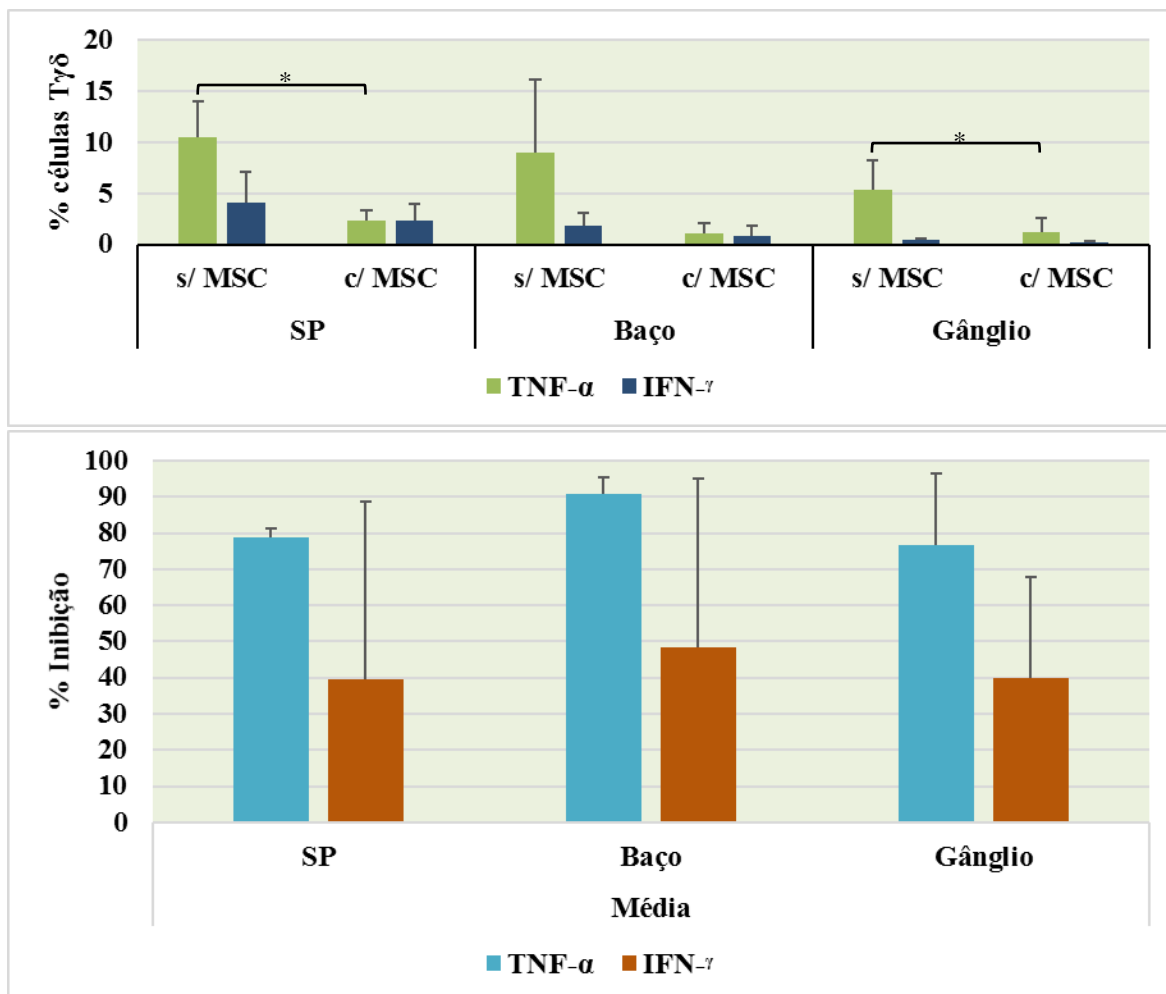


Figura 11- Representação gráfica da porcentagem de linfócitos Tγδ produtores de TNF-α e IFN-γ de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua porcentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos Tγδ TNF-α+ e IFN-γ+. As barras representam a média ± desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* < 0,05 (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC; a, teste de *Tukey*: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).

A porcentagem de linfócitos TCD4+CD8+ produtores de TNF-α e IFN-γ reduziu na presença das MSCs no SP, no baço e no gânglio (**Tabela 4 e Figura 12**). A redução das células produtoras de TNF-α no SP e no baço e de IFN-γ no SP apresentaram significado estatístico. Quanto à porcentagem de inibição (**Tabela 5 e Figura 12**), verificou-se que os três ambientes imunológicos apresentaram um padrão de inibição semelhante para os linfócitos TCD4+CD8+ produtores de TNF-α e IFN-γ.

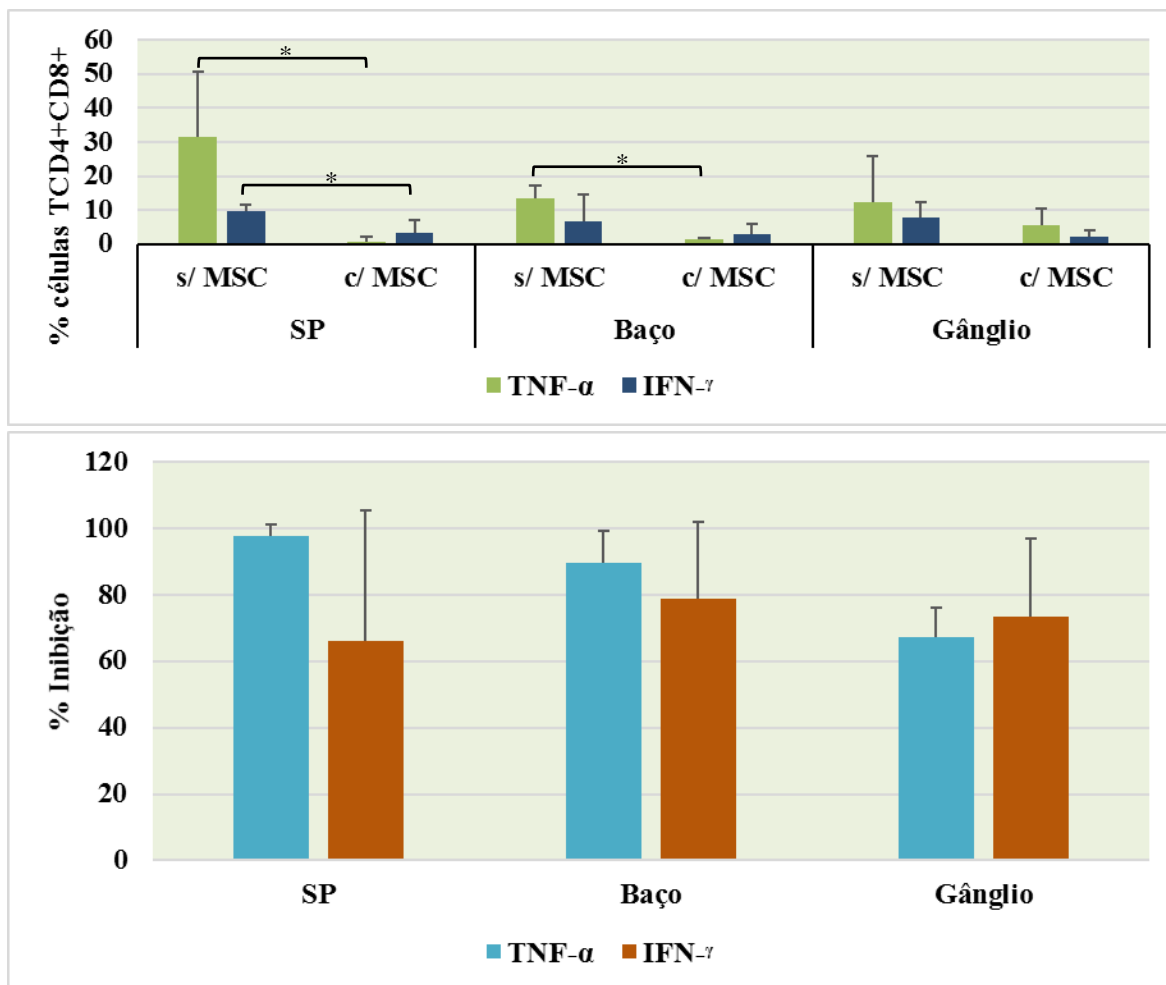


Figura 12- Representação gráfica da porcentagem de linfócitos T CD4CD8 produtores de TNF- α , IFN- γ e IL-2 de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, na presença e ausência de MSCs, e sua porcentagem de inibição. Após co-cultura de MNCs do SP, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foram quantificados os linfócitos T CD4+CD8+ TNF- α + e IFN- γ +. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* <0,05 (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC; a, teste de *Tukey*: SP vs. baço/SP vs. gânglio/gânglio vs. baço).

4.3. Análise da expressão gênica em linfócitos Th, Tc e T $\gamma\delta$ e MSCs

Após co-cultura de células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio, com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, e após ativação *in vitro* com PMA e ionomicina durante 4 horas, foi realizada a separação celular das células: linfócitos

Th (CD3+CD4+CD8-), linfócitos Tc (CD3+CD8+CD4-), linfócitos T $\gamma\delta$ (CD3+CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +) e MSCs (CD45-CD49e+). Posteriormente foi realizada a análise da expressão gênica de IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos Th e Tc, de perforina em T $\gamma\delta$ e de IDO em MSCs.

4.3.1. Expressão de mRNA dos genes IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos Th e Tc

A quantidade relativa de expressão de mRNA de IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos Th e Tc na ausência e presença de MSCs não apresentou diferenças com significado estatístico nos três ambientes imunológicos (**Figura 13 e 14**). Ao nível do SP verificou-se níveis muito baixos de expressão de mRNA destes genes por estas subpopulações de linfócitos na presença e ausência das MSCs.

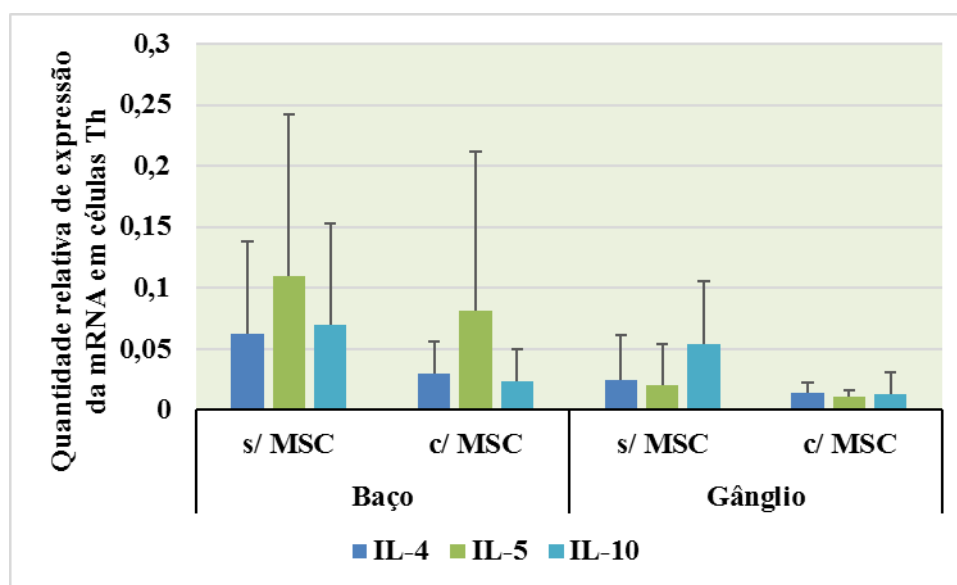


Figura 13- Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos Th purificados, de biópsias de baço e gânglio, após cultura na presença e ausência de MSCs com ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* <0,05 (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC).

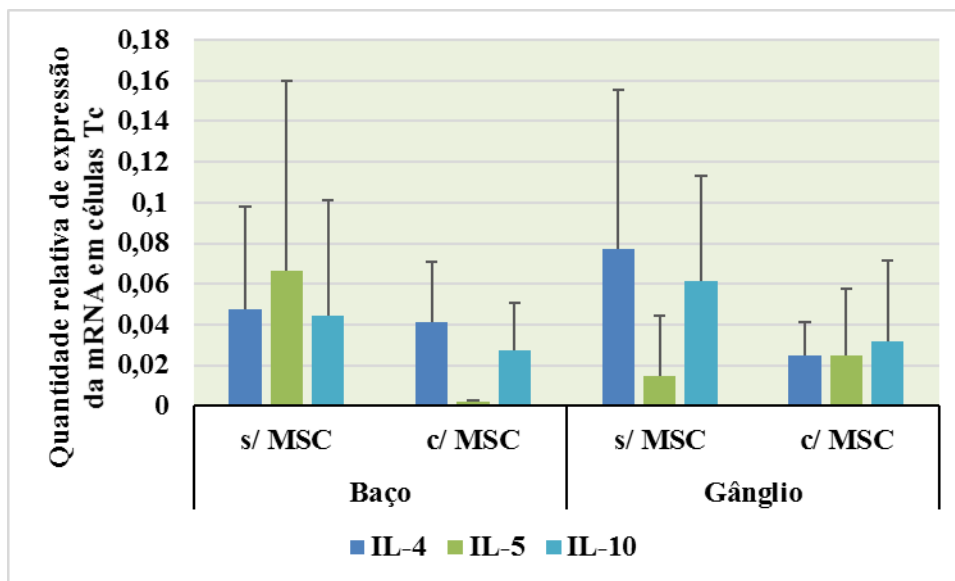


Figura 14- Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos Tc purificados, de biópsias de baço e gânglio, após cultura na presença e ausência de MSCs com ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando *p-value* <0,05 (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC).

4.3.2. Expressão de mRNA do gene da perforina pelos linfócitos T $\gamma\delta$

A quantidade relativa de expressão de mRNA da perforina pelos linfócitos T $\gamma\delta$ na presença de MSCs diminui no SP. Em contrapartida, no baço e no gânglio, a presença das MSCs resultou num aumento dos níveis de mRNA de perforina. No entanto, estes resultados não apresentam significado estatístico (**Figura 15**).

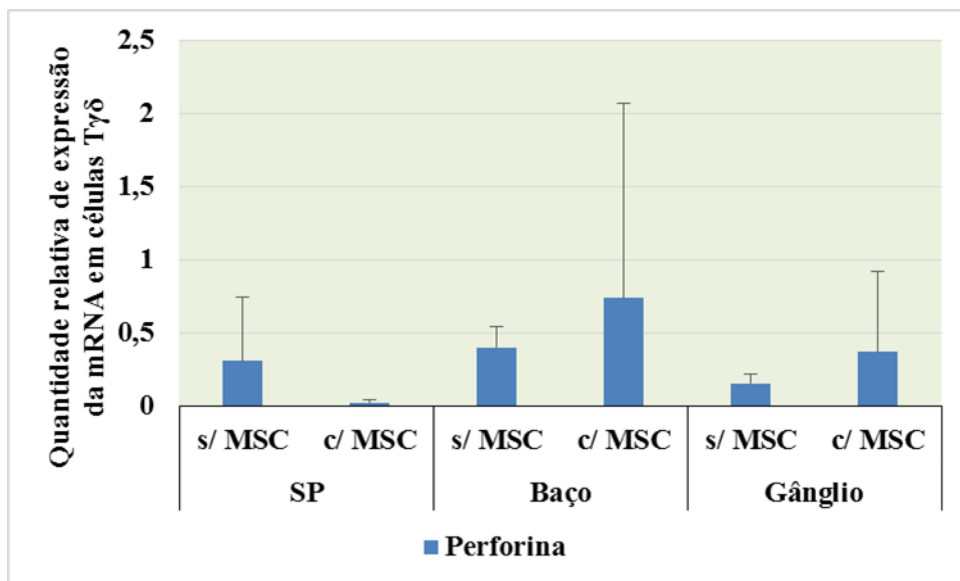


Figura 15- Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de perforina em linfócitos T $\gamma\delta$ purificados, de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio, após cultura na presença e ausência de MSCs com ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando $p < 0,05$ (*, teste *t-student*: sem MSC vs. com MSC).

4.3.3. Expressão de mRNA do gene do IDO pelas MSCs

A cultura de MSCs na presença de MNCs do SP mostrou uma redução da expressão de mRNA da IDO pelas MSCs enquanto a presença de MNCs do baço e gânglio levou a um aumento da sua expressão, em comparação com as MSCs que não tiveram contato com MNCs. (**Figura 16**). Contudo estes resultados não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

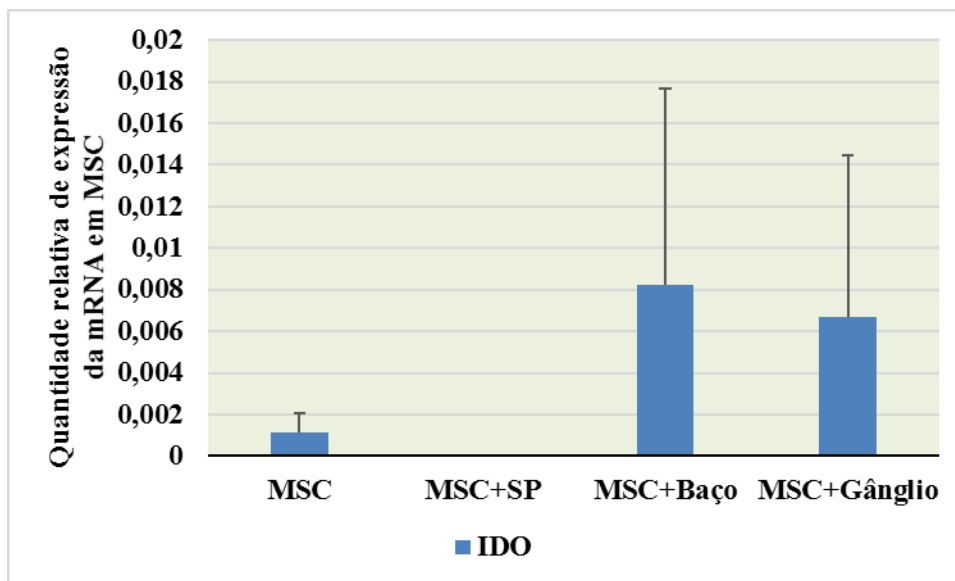


Figura 16- Representação gráfica da quantidade relativa de expressão de mRNA de IDO em MSC purificadas, após cultura sem e com MNCs de amostras de sangue periférico e biópsias de baço e gânglio e após ativação com PMA e ionomicina. As barras representam a média \pm desvio padrão, com significado estatístico quando $p < 0,05$ (*, teste ANOVA I: MSC vs. MSC+SP vs. MSC+baço vs. MSC+gânglio).

5. Discussão

Todos os componentes do SI permitem uma resposta imunológica efetiva e bem coordenada, fundamental na defesa do organismo. Os linfócitos T são elementos fundamentais na imunidade, tanto por produzirem reações imunológicas específicas para combater infecções e neoplasia, como também por dirigirem e regularem as respostas imunes.

As MSCs têm tido um crescente interesse como potencial terapêutico nestas patologias devido ao seu efeito anti-inflamatório e imunomodulador sobre as células do SI. A capacidade de autorrenovação, diferenciação e migração também tornam estas células atrativas para a terapia celular na reparação de tecidos. O efeito imunossupressor das MSCs sobre a proliferação dos linfócitos T e as respostas imunes mediadas pelos mesmos tem sido amplamente documentado e, mais recentemente, para diferentes subpopulações de linfócitos Th, como linfócitos Th1, Th2 e Th17. Por outro lado, este efeito inibitório carece de dados em relação a subpopulações de linfócitos T "não convencionais", como os linfócitos Th9, T $\gamma\delta$ e T CD4+CD8+. Uma questão que também se coloca é se esta função imunomoduladora mediada pelas MSCs é influenciada pelo ambiente imunológico das células do sistema imune. Estes dados seriam importantes para uma melhor compreensão da ação das MSCs sobre as respostas imunes *in vivo*, uma vez que estas resultam de um conjunto de diferentes ações produzidas por várias populações de células.

As MSCs foram originalmente isoladas a partir da medula óssea, mas devido às suas limitações fontes alternativas têm sido exploradas. O procedimento simples, seguro e não-evasivo de recolha das MSCs do cordão umbilical é uma das vantagens desta fonte. Além disso, as MSCs do cordão umbilical apresentam os marcadores típicos destas células, baixa imunogenicidade e elevada cinética de crescimento como as MSCs da medula óssea.

O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da ação imunomoduladora das MSCs da matriz do cordão umbilical em diferentes subpopulações de linfócitos T do sangue periférico, do baço e do gânglio linfático. Inicialmente, estes três ambientes imunológicos foram caracterizados imunofenotipicamente por citometria de fluxo, após o isolamento por gradiente de densidade das células mononucleares. A quantificação dos linfócitos T, B e células NK na celularidade total revelou percentagens de linfócitos T e B significativamente mais elevadas ao nível do baço e gânglio do que no SP. Este resultado deve-se à estrutura e funções destes órgãos linfoides. O gânglio é um órgão linfoide

secundário localizado ao longo dos vasos linfáticos por todo o organismo, onde os linfócitos T e B *naïve* respondem a antígenos provenientes dos tecidos periféricos, iniciando assim uma resposta imune adaptativa [revisado em 84]. O baço é também um órgão linfoide secundário, altamente vascularizado e com regiões onde as células do SI, principalmente os linfócitos, estão armazenados. As suas principais funções são remover as células sanguíneas lesadas e envelhecidas e partículas (como complexos imunes e microrganismos opsonizados), bem como iniciar respostas imunes adaptativas contra antígenos transportados no sangue [revisado em 85].

No sangue periférico, os linfócitos B e T e células NK apenas representam 12,2% das células mononucleares isoladas. As amostras de SP, baço e gânglio eram recolhidas de possíveis doadores para transplantação em morte cerebral. Nestes pacientes, a manutenção da hemodinâmica do organismo parece estar a levar as células da imunidade inata ao nível periférico a adquirir uma densidade celular diferente, levando a uma contaminação com estas células no anel de MNCs no isolamento por gradiente de densidade.

Os linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ apresentaram um padrão similar no SP, no baço e no gânglio. Em relação à sua distribuição pelos compartimentos funcionais *naïve*, memória e efetor, estas células apresentam um padrão de distribuição relativamente semelhante nos três ambientes imunológicos. Os linfócitos Tc efetores do gânglio apresentaram uma percentagem significativamente inferior em relação ao SP e ao baço. Verificou-se também que os linfócitos Th, T $\gamma\delta$ e T CD4+CD8+ efetores do gânglio apresentaram percentagens inferiores em relação ao SP e ao baço, embora sem significado estatístico. Estas percentagens inferiores das subpopulações de linfócitos T efetores ao nível do gânglio poder-se-ão dever-se ao facto de que os linfócitos T, após adquirirem características efectoras, migrarem para os tecidos periféricos. No gânglio, os linfócitos T *naïves* após o contato com o antígeno sofrem expansão clonal, adquirindo assim funções efectoras [revisado em 84]. Ao contrário das células T *naïve*, as células efectoras podem produzir citocinas, matar células que expressem o antígeno (no caso de linfócitos Tc) ou modificar o comportamento de outros leucócitos (no caso dos linfócitos Th), e expressar moléculas que lhes permitem migrar para os tecidos periféricos. Por outro lado, a percentagem similar de células T *naïve*, de MC e de ME, nos três ambientes imunológicos, pode dever-se à recirculação constante destas células entre o sistema linfático e o sangue periférico.

As MSCs são células altamente sensíveis ao microambiente, o que lhes permite alterar rapidamente o seu perfil de expressão de proteínas, a fim de adaptar as suas funções às necessidades fisiológicas do organismo, contribuindo assim para a manutenção da homeostase. Desta forma é expectável que as condições de cultura, durante a expansão celular ou em ensaios *in vitro*, possam alterar o fenótipo e a função destas células. Alguns desses fatores incluem: o número de passagens das MSCs [86], o *ratio* de MSCs:células imunes [87,88], as células imunes presentes na cultura celular [61] e o estado de ativação das células imunes [88]. Para evitar alterações de fenótipo e função das MSCs, neste trabalho foram usadas células da matriz do cordão umbilical com expansão celular máxima até à passagem 5 e um *ratio* de 1:2 (MSC:MNC).

Após a co-cultura de células mononucleares de sangue periférico, do baço e do gânglio com e sem adição de MSCs da matriz do cordão umbilical, com ativação *in vitro* com PMA e ionomicina, as subpopulações de linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ foram identificadas por citometria de fluxo, bem como frequência destas células a produzir as citocinas intracelulares TNF- α , IL-17, IFN- γ , IL-9, IL-2 e IL-10. A presença das MSCs resultou numa diminuição significativa da percentagem de linfócitos Th1 produtores de TNF- α e IFN- γ no SP, no baço e no gânglio. Apesar da falta de significado estatístico, os linfócitos Th1 produtores de IL-2 também apresentaram uma tendência para a diminuição da sua percentagem. Estes dados vão de acordo com vários trabalhos publicados que descrevem um efeito inibidor sobre a diferenciação e função dos linfócitos Th1, associado a uma diminuição da expressão de IFN- γ e TNF- α por estas células [15,50,89–91]. Quanto à IL-2, um estudo de Laranjeira *et al* mostrou que a percentagem de linfócitos Th produtores desta interleucina também está reduzida em co-culturas de MSCs e PBMC estimuladas com PMA e ionomicina [48]. Outros estudos mostram que a presença de MSC em culturas de PBMCs ou culturas de linfócitos estimulados com PHA (fitohemaglutinina) diminui a expressão de mRNA de IL-2 em linfócitos Th purificados, bem como os níveis solúveis de IL-2 detetada no sobrenadante da cultura [39,92].

No que diz respeito aos linfócitos Tc1, a redução da percentagem de linfócitos Tc produtores de TNF- α apresentou significado estatístico nos três ambientes imunológicos, enquanto que linfócitos Tc produtores de IFN- γ e IL-2 apenas o apresentaram no SP e no baço, respetivamente. Vários autores estudaram o efeito das MSCs nos linfócitos Tc, tendo-

se verificado que as MSCs têm capacidade de inibir a atividade citolítica mediada por CTL [56,93,94] e reduzir a secreção de granzima B, TNF- α e IFN- γ [15,48,93,95,96].

A presença das MSCs resultou numa diminuição da percentagem de linfócitos Th17 nos três ambientes imunológicos, com significado estatístico no baço. Na literatura, existem dados contraditórios sobre a influência das MSC na função dos linfócitos Th17 totalmente diferenciadas. Sob diferentes condições, as MSCs podem favorecer [90] ou prejudicar a função das células Th17, incluindo a produção de IL-17A, IL-17F, IL-22, TNF- α e IFN- γ [48,55,91,97,98]. Laranjeira *et al* verificou que a presença de MSCs em culturas de MNCs estimulada resultou numa diminuição da percentagem de células Th17 e Tc17 para todos os indivíduos em estudo [48]. A inibição da diferenciação de linfócitos Th17 e da redução da expressão de IL-17A e IL-22 mediada por MSC (de humano e de ratinho) têm sido atribuídas à PGE2, à expressão de Foxp3 e de IL-10 [55,97]. Linfócitos Th17 diferenciados foram convertidos em linfócitos T reguladores funcionais, tendo estes efeitos supressores sobre a proliferação das células T [55].

Em relação ao efeito das MSCs sobre os linfócitos Th9, os resultados revelaram uma tendência para a diminuição na percentagem de linfócitos Th produtores de IL-9, tanto no SP como no baço e no gânglio. Apesar da ausência de significado estatístico, esta redução vai ao encontro de um estudo de Laranjeira *et al*, onde se verificou que a percentagem de linfócitos Th IL-9+ diminuiu em co-culturas de MSCs e MNCs após estimulação com PMA e ionomicina [48].

Na percentagem de linfócitos Th produtores de IL-10 não se observou uma inibição destas células na presença de MSCs. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, envolvida em vários processos imunossupressores. Estudos recentes demonstraram que as MSCs regulam positivamente a expressão de IL-10 em células Th produtoras de IFN- γ , sendo atribuída a estas células T a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T de uma forma dependente de IL-10 [99,100]. Desta forma, poderá estar a ocorrer um aumento da diferenciação das células Th do sangue periférico no sentido da produção desta citocina anti-inflamatória (diferenciação em células T reguladoras/Th2/Th3).

No que diz respeito aos linfócitos T $\gamma\delta$, a percentagem destas células produtoras de TNF- α e IFN- γ reduziu na presença das MSCs nos três ambientes imunológicos, com significado estatístico no SP e no gânglio. Na literatura existem poucos dados, sendo estes contraditórios quanto ao efeito das MSCs sobre a produção de citocinas e a atividade citolítica dos

linfócitos T $\gamma\delta$. Prigione *et al* [101] observou que as MSCs não inibiram a produção de TNF- α e de IFN- γ pelos linfócitos T V γ 9+V δ 2+ estimulados com IPP (isopentenilpirofosfato), enquanto a expressão de ambas as citocinas foram suprimidas quando esta subpopulação celular foi estimulada com BrHPP (bromohidrina pirofosfato) [102].

A percentagem de linfócitos TCD4+CD8+ produtores de TNF- α e IFN- γ reduziu na presença das MSCs no SP, no baço e no gânglio. Esta subpopulação apresenta frequências muito baixas ao nível do SP, baço e gânglio, não existindo estudos sobre o efeito das MSCs sobre os linfócitos T CD4+CD8+.

As MSCs exerceram um efeito inibitório forte sobre os linfócitos T do sangue periférico, do baço e do gânglio linfático (percentagens de inibição entre os 40-95%), exceto para os linfócitos Th produtores de IL-10. Contudo, este efeito inibitório parece ter um padrão semelhante entre os três ambientes imunológicos, uma vez que não se verificou diferenças com significado estatístico, exceto para os linfócitos Th produtores de IL-2. Esta ação inibitória similar poderá estar associada às frequências dos linfócitos Th, Tc, T $\gamma\delta$ e TCD4+CD8+ e à sua distribuição pelos compartimentos funcionais, uma vez que também apresentam um padrão de distribuição semelhante entre o SP, o baço e o gânglio. Os linfócitos Th produtores de IL-2 do SP mostraram ser menos sensíveis que os do baço e do gânglio, apesar da distribuição dos linfócitos Th nos seus compartimentos ser semelhante nos três ambientes imunológicos. Seria útil saber o efeito das MSCs sobre a frequência de linfócitos Th produtoras de IL-2 nos diferentes compartimentos funcionais.

No estudo da expressão génica, é importante referir que a separação celular apenas permitiu a purificação de uma média de 7000 células por condição, o que parece ter levado a uma baixa quantidade de cDNA extraído e, conseqüentemente, a reduzidas quantidades relativas de mRNA. A quantidade relativa de expressão de mRNA de IL-4, IL-5 e IL-10 pelos linfócitos Th e Tc na ausência e presença de MSCs não apresentou diferenças com significado estatístico nos três ambientes imunológicos. Na literatura são reportados dados contraditórios: Aggarwal *et al* observou que MSCs aumentaram a expressão de IL-4 em linfócitos T *naïve* [50]; Eljaafari *et al* observou que a presença de MSCs levou a uma diminuição da expressão de mRNA de IL-4 e IL-10 em linfócitos Th [103]; Laranjeira *et al* observou uma diminuição da expressão de mRNA de IL-10 e um aumento da IL-4 [48].

Na expressão relativa de mRNA de perforina em linfócitos T $\gamma\delta$, observa-se uma tendência para a sua diminuição ao nível do SP e um aumento ao nível do baço e gânglio, na

presença de MSCs. Os estudos dos efeitos das MSCs sobre a atividade citolítica dos linfócitos T $\gamma\delta$ mostram que as MSCs tanto melhoram a atividade citolítica destes linfócitos como a podem suprimir [101,102].

A expressão relativa de mRNA de IDO pelas MSCs na presença de MNCs do baço e gânglio é superior à expressão pelas MSCs isoladas. Já na presença de MNCs do SP, a expressão mRNA de IDO pelas MSCs é muito reduzida. Sabe-se que algumas funções imunomoduladoras das MSCs não são expressas constitutivamente, mas são induzidas pela citocina pró-inflamatória IFN- γ , sozinha ou concomitante com TNF- α , IL-1 α , ou IL-1 β , secretados por linfócitos ativados [67–69]. Por sua vez, estas citocinas induzem as MSCs a produzir vários fatores solúveis que medeiam a sua atividade imunossupressora. A IDO é uma enzima expressa pelas MSCs que tem um efeito supressor sobre a proliferação dos linfócitos T. Uma vez que o baço e gânglio apresentam uma percentagem superior de linfócitos T quando comparado com células mononucleares do SP, a produção de IFN- γ pelos linfócitos T também deverá ser superior nestes ambientes do que no SP. Desta forma, as MSCs na presença de MNCs do baço e gânglio serão mais induzidas a produzir a IDO.

De uma forma geral, as MSCs da matriz do cordão umbilical inibiram a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos T de sangue periférico, baço e gânglio, que no global foi semelhante nos três tipos de ambientes imunológicos.

6. Conclusão

Este estudo mostrou que as MSCs da matriz do cordão umbilical inibiram de forma similar as diferentes populações funcionais de linfócitos T produtores de citocinas pró-inflamatórias provenientes do sangue periférico, baço ou gânglio linfático, com exceção dos linfócitos Th produtores de IL-2, onde as células provenientes do sangue periférico parecem ser menos sensíveis à ação imunomoduladora das MSCs. Como esperado, não se observou uma inibição dos linfócitos Th produtores de IL-10, parecendo até ocorrer um aumento da diferenciação das células Th do sangue periférico no sentido da produção desta citocina anti-inflamatória (diferenciação em células T reguladoras/Th2/Th3), induzida pelas MSCs.

Assim, as MSCs da matriz do cordão umbilical parecem exercer uma função imunossupressora importante nos linfócitos T de diferentes ambientes inflamatórios, o que reforça a sua aplicabilidade como possível abordagem terapêutica para patologias imunológicas.

7. Referências bibliográficas

1. Maul J, Duchmann R, Zeitz M. How does the immune system work? *Chirurgische Praxis*. 2006;729–40.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv P. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Saunders; 2003.
3. Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. *Fundamentos de Imunologia*. 2ª edição. Lisboa: Lidel-edições técnicas lda; 2012.
4. Gerrits A, Dykstra B, Otten M, Bystrykh L, Haan G. Combining transcriptional profiling and genetic linkage analysis to uncover gene networks operating in hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunogenetics*. 2008;60(8):411–22.
5. Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(1):11842–9.
6. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387–403.
7. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. 3rd ed. Saunders; 2011.
8. Playfair J, Chain B. *Immunology at glance*. 10th ed. UK: John Wiley & Sons; 2013.
9. Hernandez JB, Newton RH, Walsh CM. Life and death in the thymus - cell death signaling during T cell development. *Curr Opin Biol*. 2011;22(6):865–71.
10. Sompayrac L. *How the Immune System works*. 4th ed. USA: John Wiley & Sons; 2012.
11. Mackay CR. Immunology: Dual personality of memory T cells. *Nature*. 1999;401:659–60.

12. Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, de Souza AWS, Cruvinel WDM, Andrade LEC, da Silva NP. Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Bras J Rheumatol*. 2010;50(5):566–80.
13. Dong C, Martinez GJ, T C. T cells: the usual subsets. *Natures Rev Immunol*. 2010;54(1):77030.
14. Poholek AC, Craft J. Competing for help: new insights into the function of follicular helper T cells. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(6):438–9.
15. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(4):34–43.
16. Gol-Ara M, Jadidi-Niaragh F, Sadria R, Azizi G, Mirshafiey A. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:1–16.
17. Wan YY, Flavell RA. How Diverse-CD 4 Effector T Cells and their Functions. *J Mol Cell Biol*. 2009;1:20–36.
18. Serrano Hernández A. Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. *Reum Clin*. 2009;5(1):1–5.
19. Brandes M. Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ T Cells. *Science* (80-). 2005;309(5732):264–8.
20. Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):31–8.
21. Ribot JC, DeBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, Girardi M, Borst J, Hayday AC, Pennington DJ, Silva-Santos B. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat Immunol*. 2009;10(4):427–36.
22. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-

- 1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood*. 2009;113(26):6611–8.
23. Chen L, He W, Kim ST, Tao J, Gao Y, Chi H, Intlekofer AM, Harvey B, Reiner SL, Yin Z, Flavell RA, Craft J. Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells. *J Immunol*. 2007;178(5):2730–6.
 24. Vermijlen D, Ellis P, Langford C, Klein A, Engel R, Jomaa H, Hayday AC, Eberl M. Europe PMC Funders Group Distinct Cytokine-Driven Responses of Activated Blood $\gamma\delta$ T Cells: Insights into Unconventional T Cell Pleiotropy1. *J Immunol*. 2014;178(7):4304–14.
 25. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gd T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):662–6.
 26. Cruvinel WM, Mesquita Jr. D, Araujo J, Salmazi K, Kallas E, Andrade L. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. *Rev Bras Reum*. 2008;48(6):342–55.
 27. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kytтарis VC, Juang Y-T, Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*. 2008;181(12):8761–6.
 28. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revi Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(1):25–35.
 29. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (80-)*. 2011;284(143):143–7.
 30. Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(4):369–74.
 31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.

32. Bassi E, Alberto C, Aita M, Olsen N, Câmara S, Biológi- CDC, Aita C, Câmara N. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*. 2011;3(1):1–8.
33. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev*. 2008;8(9):726–36.
34. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:20–34.
35. Granero-Molto F, Weis J a, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(3):255–68.
36. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, Tien CH, Jeschke MG. Human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):28–41.
37. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886.
38. Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230–47.
39. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, Santos F, Henriques A, Grãos M, Cardoso CMP, Martinho A, Pais M, da Silva CL, Cabral J, Trindade H, Paiva A. 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;4(5):125–41.
40. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells Int*. 2012;2012:1–11.

41. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012;35(2):213–21.
42. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: State of the art. *Int J Clin Exp Med.* 2010;3(4):248–69.
43. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008;26(1):146–50.
44. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;9(1):12.
45. McGuirk JP, Smith JR, Divine CL, Zuniga M, Weiss ML. Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Promising Cellular Therapeutic Strategy for the Management of Graft-versus-Host Disease. *Pharmaceuticals.* 2015;8(2):196–220.
46. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;12(1):260–74.
47. Yang S, Huang S, Feng C, Fu X. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: strategies, challenges, and potential for cutaneous regeneration. *Front Med.* 2012;6(1):41–7.
48. Laranjeira P, Pedrosa M, Pedreiro S, Gomes J, Martinho A, Antunes B, Ribeiro T, Santos F, Trindade H, Paiva A. Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:3–17.
49. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *2010;183(12):7787–98.*

50. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Transplantation*. 2009;105(4):1815–22.
51. Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105(7):2821–8.
52. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*. 2007;25(7):1753–60.
53. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755–61.
54. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Hematol J*. 2007;92(7):881–8.
55. Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype. *J Immunol*. 2010;185(1):302–12.
56. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le B. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003;76:1208–13.
57. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Millo E, Ferrone S, Barnaba V, Pistoia V. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells*. 2008;26(5):1275–87.
58. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Mult Scler*. 2006;107(1):367–72.

59. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol.* 2007;65(4):3363–43.
60. Jiang X, Zhang Y, Liu B. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2005;105(10):4120–6.
61. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. 2015;108(6):2114–21.
62. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105(5):2214–9.
63. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107(4):1484–90.
64. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111(3):1327–33.
65. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells.* 2008;26(1):151–62.
66. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(7):410–5.
67. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlaschi V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human

- Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386–98.
68. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141–50.
 69. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):353–63.
 70. O’Garra A, Barrat F, Castro A, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev*. 2008;223:114–31.
 71. Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, Urbich C, Rosenthal N, Zeiher AM, Dimmeler S. Interleukin-10 From Transplanted Bone Marrow Mononuclear Cells Contributes to Cardiac Protection After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2008;103(2):203–11.
 72. Yang S-H, Park M-J, Yoon I-H, Kim S-Y, Hong S-H, Shin J-Y, Nam H-Y, Kim Y-H, Kim B, Park C-G. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009;41(5):315–24.
 73. Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. The Role of IL-6 in Inhibition of Lymphocyte Apoptosis by Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(3):745–750.
 74. Yoo SW, Chang DY, Lee HS, Kim GH, Park JS, Ryu BY, Joe EH, Lee YD, Kim SS, Suh-Kim H. Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- β . *Neurobiol Dis*. 2013;58:249–57.
 75. Nicola M Di, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838–43.
 76. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow

- stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2014;103(12):4619–22.
77. Tse W, Pendleton J, Beyer W, Egalka M, Guinan E. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75:389–97.
 78. Kang JW, Kang K-S, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(4):681–93.
 79. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34+-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol*. 2006;177(4):2080–7.
 80. Chen K, Wang D, Du WT, Han Z-B, Ren H, Chi Y, Yang SG, Zhu D, Bayard F, Han ZC. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol*. 2010;135(3):448–58.
 81. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs : central role of MSC-derived prostaglandin E 2. *Hematop Stem Cells*. 2009;113(26):6576–84.
 82. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26(1):212–22.
 83. Leite C, Silva NT, Mendes S, Ribeiro A, De Faria JP, Lourenço T, Santos F Dos, Andrade PZ, Cardoso CMP, Vieira M, Paiva A, Da Silva CL, Cabral JMS, Relvas JB, Grãos MR. Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage.

- PLoS One. 2014;9(10).
84. Andrian UH von, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):867–78.
 85. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606–16.
 86. Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):53–66.
 87. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Kazan HF, Bruyn C De, Meuleman N, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton’s Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol.* 2010;264(2):171–9.
 88. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 2008;251(2):131–6.
 89. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Uccelli A, Gerdoni E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. 2008;106(5):1755–61.
 90. Darlington PJ, Boivin MN, Renoux C, François M, Galipeau J, Freedman MS, Atkins HL, Cohen JA, Solchaga L, Bar-Or A. Reciprocal Th1 and Th17 regulation by mesenchymal stem cells: Implication for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;68(4):540–5.
 91. Luz-Crawford P, Noël D, Fernandez X, Khoury M, Figueroa F, Carrión F, Jorgensen C, Djouad F. Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway. *PLoS One.* 2012;7(9).
 92. Alipour R, Adib M, Karimi MM, Hashemi-Beni B, Sereshki N. Comparing the

- immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2013;12(4):331–44.
93. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF-. *J Immunol.* 2010;184(10):5885–94.
 94. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005;90(4):516–25.
 95. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells.* 2007;25(7):1753–60.
 96. Hof-Nahor I, Leshansky L, Shivtiel S, Eldor L, Aberdam D, Itskovitz-Eldor J, Berrih-Aknin S. Human mesenchymal stem cells shift CD8+ T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes. *J Cell Sci.* 2012;125:4640–50.
 97. Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, English K, Shaw G, Murphy JM, Barry FP, Mahon BP, Belton O, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol.* 2011;41(10):2840–51.
 98. Lee JJ, Jeong HJ, Kim MK, Wee WR, Lee WW, Kim SU, Sung C, Yang YH. CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function. *Purinergic Signal.* 2014;10(2):357–65.
 99. Selleri S, Dieng MM, Nicoletti S, Louis I, Beausejour C, Le Deist F, Haddad E. Cord-Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Downmodulate CD4 + T-Cell Activation by Inducing IL-10-Producing Th1 Cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(7):1063–75.

100. Saygılı T, Akıncılar S, Akgül B, Nalbant A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* GroEL Protein Promotes Conversion of Human CD4⁺ T Cells into IFN γ IL10 Producing Tbet⁺ Th1 Cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e49252.
101. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells*. 2009;27(3):693–702.
102. Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournie JJ, Poupot R. A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):752–62.
103. Eljaafari A, Tartelin ML, Aissaoui H, Chevrel G, Osta B, Lavocat F, Miossec P. Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: Contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(7):2147–57.