

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

***Papel do óxido nítrico derivado de células mesenquimais estromais
na modulação da resposta imune na Doença Inflamatória Intestinal***

Beatriz Coutinho de Sousa

Uberaba-MG

2012

Beatriz Coutinho de Sousa

Papel do óxido nítrico no transplante alogênico de células mesenquimais estromais na Doença Inflamatória Intestinal

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e infectologia, área de concentração “Área de Concentração II: Parasitologia e Imunologia Aplicadas”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Uberaba

2012

Dedicatória

*Dedico aos meus pais, Vânia e Hernano
por serem meus maiores incentivadores e
enfrentarem comigo todas as dificuldades.*

“Nem sempre as coisas serão como pensamos ou queremos e às vezes no momento nada fará sentido, mas quando realmente acabar veremos que tudo tinha que ser exatamente como foi porque em tudo existe um propósito e um aprendizado, até mesmo nas coisas que no momento nos parecem ruins.”

Autoria própria

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por colocar em meu caminho essa oportunidade, e por ser fiel a mim, mesmo sem eu merecer. Obrigada por renovar minhas forças todos os dias!

Aos meus pais, Hermano e Vânia, pelo amor, compreensão e conselhos, e que mesmo não entendendo a ciência procuravam de todas as maneiras me ajudar, orientar e incentivar. Sou muito feliz por ser filha de vocês, pessoas de sabedora ímpar, que me alicerçam e são em todos os momentos meu porto seguro.

Ao meu noivo Moises, por compreender minha ausência, e incentivar minhas escolhas, você é um presente de Deus para minha vida!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, por ser em muitos momentos mais que orientadora, pela sua hospitalidade nas inúmeras estadas em Ribeirão Preto, por abrir as portas de sua casa e, sobretudo pelo privilégio de partilhar dos seus conhecimentos que me proporcionaram desvendar um mundo tão desconhecido e contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Vanessa Beatriz e Haline Ogata, que além de colaboradoras desse trabalho, se tornaram grandes amigas. Saiba que aprendi muito com vocês e desejo de todo meu coração que em seus caminhos encontrem pessoas tão maravilhosas como eu tive a sorte de encontrar.

Aos colaboradores desse trabalho, Monique Fonseca, Prof^a Dr^a Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, Prof. Dr. Javier Lazo Chica, Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior, Prof. Dr. João Santana Silva e ao Prof. Dr. Júlio César Voltarelli (*in memoriam*), pela tão importante colaboração sem a qual esse trabalho não teria sido realizado.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da UFTM, em especial ao Marcos Vinicius, pessoa admirável, por sempre me incentivar e mostrar que pesquisa não se faz sozinho e sim em equipe.

Aos colegas de pesquisa, Francielle Guimarães, Patrícia Reis, Thaís Farnesi, Ton Sales e Tiago Álvares, pelos momentos tensos e de descontração. Juntos fica mais fácil ultrapassar algumas barreiras.

Aos funcionários dos Laboratórios de Biologia Celular da UFTM, e Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação de Ribeirão Preto, em especial ao João Batista e a Viviani Nardini, por serem bons profissionais e com isso contribuírem para que essa pesquisa fosse realizada.

As minhas amigas Helionay Silva que é mais que uma amiga, uma irmã, e a Sandra Mara Dantas que tem se tornado uma pessoa muito especial, a qual admira e tem me ensinado muito.

A minha família, e a todos os amigos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui, em especial, a minha professora Irene, que me mostrou esse caminho e fez muito por mim.

A todos vocês, obrigado é uma palavra muito simples para expressar minha gratidão!

O presente trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Resumo

1 As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças crônicas recidivantes que resultam
2 em diarreia, dor abdominal, sangramento retal e desnutrição. A inflamação na colite
3 ulcerativa (UC) se restringe à camada mucosa colônica, enquanto que a Doença de Crohn
4 (DC) é caracterizada por infiltrado transmural que pode ocorrer em qualquer parte do trato
5 gastrointestinal. A DC está associada à resposta Th1, a UC representa uma resposta Th2
6 atípica e o padrão Th17 está presente em níveis aumentados na mucosa inflamada de
7 ambas DC e UC. O tratamento rotineiramente utilizado na DII inclui vários fármacos e
8 cirurgias; entretanto, a terapêutica disponível não representa a cura da DII que pode
9 aumentar a suscetibilidade ao câncer cólon-retal, justificando assim a busca por novas
10 modalidades terapêuticas. As células mesenquimais estromais (MSC) são células
11 multipotentes que possuem capacidade imunorreguladora, sendo por isso consideradas
12 importante arma terapêutica para várias doenças inflamatórias crônicas, entre elas a DII.
13 Essas células suprimem a resposta imunológica por vários mecanismos, como pela
14 produção de óxido nítrico (NO), induzido pela ativação da enzima óxido nítrico sintase
15 induzível (iNOS). Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar o potencial
16 terapêutico das MSC provenientes de camundongos WT e MSC iNOS^{-/-} na DII. As MSC
17 foram isoladas da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS^{-/-},
18 cultivadas e caracterizadas. A DII foi induzida nos camundongos BALB/c com injeção
19 intrarretal de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Após a indução da doença, os animais
20 foram tratados com as MSC WT ou deficientes de iNOS e eutanasiados aos 3, 7 e 14 dias
21 para a coleta do intestino e sangue periférico. Foram avaliados parâmetros clínicos e a
22 resposta inflamatória intestinal e sistêmica após o tratamento com MSC. Os resultados
23 mostraram que ambas MSC apresentaram marcadores de superfície e plasticidade
24 inerentes a este tipo celular embora as MSC iNOS^{-/-} tenham apresentado deficiência na
25 diferenciação para osteoblasto. Nos animais tratados houve redução dos sinais clínicos e
26 aumento da sobrevivência, normalização dos leucócitos sistêmicos e alterações nas
27 populações de neutrófilos e eosinófilos infiltrantes no intestino. Ambas as MSC levaram à
28 diminuição da inflamação local e reestabelecimento da arquitetura intestinal, sendo que a
29 regulação do processo inflamatório local foi induzida por vias diferentes. As MSC WT foram
30 capazes de controlar a resposta Th17 gerando aumento de IL-10 enquanto as MSC iNOS^{-/-}
31 modularam a imunidade da mucosa intestinal desviando a resposta para o padrão Th2.
32 Finalmente, este estudo contribuiu para a elucidação dos mecanismos que medeiam o
33 potencial terapêutico das MSC na DII.

34 Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal. Células mesenquimais estromais.
35 Transplante alogênico. Óxido nítrico. Óxido nítrico sintase.

Abstract

1 Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are chronic relapsing diseases that result in diarrhea,
2 abdominal pain, rectal bleeding and malnutrition. The inflammation in ulcerative colitis (UC)
3 is restricted to the colonic mucosa, whereas Crohn's disease (CD) is characterized by
4 transmural infiltration that may affect any part of the gastrointestinal tract. CD is
5 characterized by a Th1 response and UC presents an atypical Th2 response, while Th17 is
6 present in elevated levels in inflamed mucosa of both CD and UC. The treatment routinely
7 used in IBD includes various drugs and surgeries; however, no currently available therapy
8 represents the cure for IBD, which may also predispose to colorectal cancer. Then, new
9 therapeutic approaches are necessary for better control of IBD. Mesenchymal stromal cells
10 (MSC) are multipotent cells that have immunoregulatory properties and are therefore
11 considered as important therapeutic tool for various chronic inflammatory diseases, including
12 IBD. These cells suppress the immune response by several mechanisms, such as by the
13 production of nitric oxide (NO) induced by activation of inducible Nitric Oxide Synthase
14 (iNOS). In this context, this study aimed to assess the therapeutic potential of MSC from WT
15 or iNOS^{-/-} mice in IBD. IBD was induced in BALB/c mice by intrarretal enema of
16 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). Animals were treated with allogeneic MSC derived from
17 the bone marrow of WT or iNOS^{-/-} C57BL/6 mice and were euthanized 3, 7 or 14 days later.
18 The results showed that both MSC showed surface markers and plasticity inherent to this cell
19 type although MSC iNOS^{-/-} were not able to differentiate into osteoblasts. Treated animals
20 had decreased disease clinical signs and increased survival, besides normalization of
21 systemic leukocyte counts and changes in populations of neutrophils and eosinophils in the
22 intestine. Both MSC led to decreased local inflammation and reestablishment of intestinal
23 architecture. However, the local inflammation was differentially modulated by MSC
24 depending on the presence of NO, since WT MSC controlled the Th17 response and led to
25 increased IL-10 levels while the iNOS^{-/-} MSC induced a shift to the Th2 response in the gut.
26 Finally, this study contributed to the elucidation of the mechanisms that mediate the
27 therapeutic potential of MSC in IBD.

28

29 Keywords: Inflammatory Bowel Disease. Mesenchymal stromal cells. Allogeneic
30 transplantation. Nitric oxide. Inducible nitric oxide synthase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	Figura 1 - Esquema de indução de colite por TNBS, infusão de PBS e etanol, com	
2	posterior eutanásia dos mesmos para coleta das amostras.....	42
3	Figura 2 - Caracterização imunofenotípica de células mesenquimais (MSC) isoladas	
4	de medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS ^{-/-} saudáveis.	47
5	Figura 3 - Caracterização imunofenotípica de outros tipos celulares nas culturas de	
6	células mesenquimais estromais (MSC) isoladas de medula óssea de camundongos	
7	C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS ^{-/-} saudáveis.....	48
8	Figura 4 - Fotomicrografias da diferenciação de células mesenquimais estromais	
9	(MSC) em quarta passagem, provenientes de medula óssea de camundongos	
10	C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS ^{-/-} , em osteoblastos.	49
11	Figura 5 - Fotomicrografias da diferenciação de células mesenquimais estromais	
12	(MSC) em quarta passagem, provenientes de medula óssea de camundongos	
13	C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS ^{-/-} , em adipócitos.	50
14	Figura 6 - Avaliação do peso de camundongos BALB/c durante os sete primeiros	
15	dias após infusão de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite,	
16	PBS ou etanol, e posterior tratamento com várias concentrações de células	
17	mesenquimais estromais (MSC)	51
18	Figura 7 - Escore clínico de camundongos BALB/c durante os sete primeiros dias	
19	após infusão de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite, PBS	
20	ou etanol, e posterior tratamento com várias concentrações de células	
21	mesenquimais estromais (MSC).	53
22	Figura 8 - Avaliação de sobrevivência dos animais durante os sete primeiros dias após	
23	indução da colite e infusão de células mesenquimais estromais (MSC) WT.	54
24	Figura 9 - Avaliação do peso de camundongos BALB/c durante 3, 7 e 14 dias após	
25	indução de colite, enema com PBS ou etanol, e posterior infusão de células	
26	mesenquimais estromais (MSC) de C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS ^{-/-}	55
27	Figura 10 - Avaliação diária do escore clínico após a indução da colite e tratamento	
28	com células mesenquimais estromais (MSC) WT ou iNOS ^{-/-}	57
29	Figura 11 - Avaliação de sobrevivência dos animais durante os sete primeiros dias após	
30	indução da colite e infusão de células mesenquimais estromais (MSC) WT ou INOS-	
31	/-.	58
32	Figura 12 - Contagem diferencial de células polimorfonucleares no sangue periférico.	
33	60

1	Figura 13 - Contagem diferencial de leucócitos mononucleares no sangue periférico.	
2	61
3	Figura 14 - Quantificação da inflamação intestinal na colite e após tratamento com	
4	células mesenquimais estromais (MSC).	62
5	Figura 15 - Avaliação da atividade da enzima eosinófilo-peroxidase (EPO) no cólon	
6	de camundongos com colite ou tratados com células mesenquimais estromais	
7	(MSC).	63
8	Figura 16 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no cólon de	
9	camundongos com colite ou tratados com MSC.	64
10	Figura 17 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais em 3 dias e	
11	contagem de pontos de células caliciformes expressos graficamente.	66
12	Figura 18 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais em 7 dias e	
13	contagem de pontos de células caliciformes expressos graficamente.	68
14	Figura 19 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais em 14 dias e	
15	contagem de pontos de células caliciformes expressos graficamente.	69
16	Figura 20 - Avaliação de citocinas pró-inflamatórias no cólon de camundongos com	
17	colite e tratados com células mesenquimais estromais (MSC).	71
18	Figura 21 - Avaliação de citocinas do perfil Th17 no cólon de camundongos com	
19	colite e tratados com células mesenquimais estromais (MSC).	72
20	Figura 22 - Avaliação de citocinas do perfil Th2 e IL-10 no cólon de camundongos	
21	com colite e tratados com células mesenquimais estromais (MSC).	73
22		

Lista de abreviaturas e siglas

- 1
- 2
- 3 APCs - células apresentadoras de antígenos
- 4 ASCA - anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*
- 5 CARD15 - *caspase recruitment domain*
- 6 CD - cluster de diferenciação
- 7 COX-2 - ciclo oxigenase 2
- 8 DC - doença de Crohn
- 9 DII - doenças inflamatórias intestinais
- 10 DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium
- 11 DSS - dextran sulfato de sódio
- 12 EDTA - ácido etilenodiamino tetracético
- 13 ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- 14 eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
- 15 EPO - eosinófilo-peroxidase
- 16 FITC - isotiocianato de fluoresceína
- 17 FL - histograma de fluorescência
- 18 FSC - tamanho das células (*forward site scatter*)
- 19 GVHD - resposta do enxerto versus hospedeiro (*graft versus host disease*)
- 20 HE - hematoxilina e eosina

- 1 HLA-G - antígeno leucocitário humano-G
- 2 HO - heme oxigenase
- 3 HTAB - Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio
- 4 ICAM-1 - moléculas de adesão intercelular do tipo 1
- 5 IDO - enzima indoleamina 2, 3 dioxigenase
- 6 IFN- γ - interferon γ
- 7 IL - interleucina
- 8 iNOS - óxido nítrico sintase induzida
- 9 iNOS^{-/-} - camundongos geneticamente deficientes para iNOS
- 10 LIF - fator inibidor de leucemia
- 11 LP - lâmina própria
- 12 LPS – lipopolissacarídeo
- 13 MDP - muramil dipeptídeo
- 14 MHC - complexo principal de histocompatibilidade
- 15 MO - medula óssea
- 16 MPO - Mieloperoxidase
- 17 MSC – células mesenquimais estromais
- 18 MSC iNOS^{-/-} - células mesenquimais estromais provenientes de camundongos
- 19 C57BL/6 geneticamente deficientes para iNOS

- 1 MSC WT - células mesenquimais estromais provenientes de camundongos C57BL/6 *wild*
- 2 *type* (selvagens)
- 3 NaCl - cloreto de sódio
- 4 NF- κ B - fator de transcrição nuclear κ B
- 5 NK - células natural killer
- 6 nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
- 7 NO - óxido nítrico
- 8 NOD2 - *nucleotide-binding oligomerization domain*
- 9 NOS - óxido nítrico sintase
- 10 OMPC - membrana externa de porina da *Escherichia coli*
- 11 OPD - *O -Phenylenediamine dihydrochloride*
- 12 PAS - ácido periódico de Schiff
- 13 PBS – solução salina tamponada em fosfato
- 14 PD-1 – Programmed Cell Death 1
- 15 PE - ficoeritrina
- 16 PGE2 - prostaglandina E2
- 17 R1 - região 1
- 18 SBF - Soro fetal bovino
- 19 SSC - granulidade das células (*side scatter*)
- 20 TGF- β - fator de crescimento e transformação beta

- 1 TGI - trato gastrointestinal
- 2 Th - linfócito T helper
- 3 TLRs – receptores tipo Toll
- 4 TMB - 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina
- 5 TNBS - ácido 2,4,6 Trinitrobenzeno Sulfônico
- 6 TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
- 7 Tregs - células T reguladoras
- 8 UC - colite ulcerativa
- 9 WT – camundongos selvagens (*wild type*)

LISTA DE ANEXOS

1	Anexo 1 - Parecer do Comitê de ética ao projeto.....	102
2	Anexo 2 - Parecer do Comitê de ética ao adendo.....	103
3		

SUMÁRIO

1	1	Introdução.....	20
2	1.1	Considerações Gerais	21
3	1.2	Etiopatogenia.....	22
4	1.3	Tratamento	27
5	1.4	Óxido Nítrico	31
6	2	Objetivos.....	34
7	2.1	OBJETIVO PRINCIPAL:	35
8	2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	35
9	3	Materiais e métodos.....	36
10	3.1	ANIMAIS	37
11	3.2	COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO 2, 4,6-TRINITROBENZENO SULFÔNICO (TNBS).....	37
13	3.3	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE 14 CAMUNDONGO	38
15	3.4	CULTURA DAS MSC WT e iNOS ^{-/-}	38
16	3.5	IMUNOFENOTIPAGEM DE MSC.....	39
17	3.6	DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS MSCs.....	40
18	3.7	INFUSÃO DE MSC	40
19	3.8	SCORE CLÍNICO E SOBREVIDA NA DII	41
20	3.9	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	41
21	3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA	42
22	3.11	CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	43
23	3.12	ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	43
24	3.13	ENSAIO EOSINÓFILO-PEROXIDASE (EPO).....	44

1	3.14	HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	
2		45	
3	3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4	4	Resultados.....	46
5	4.1	Caracterização das MSC.....	47
6	4.2	Resultados Clínicos	50
7	4.3	Avaliação sistêmica	58
8	4.4	Avaliação histopatológica da inflamação intestinal.....	62
9	4.5	Quantificação do infiltrado de granulócitos no cólon.....	63
10	4.5.1	Eosinófilos	63
11	4.5.2	Neutrófilos	64
12	4.6	Modulação da inflamação intestinal por MSC: citocinas.....	70
13	5	Discussão	74
14	6	Conclusões.....	87
15	6	Anexos.....	101
16	7	Referências.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O trato gastrointestinal (TGI) pode ser afetado por condições inflamatórias capazes de gerar doenças crônicas recidivantes que resultam em diarreia, dor abdominal, sangramento retal e desnutrição, denominadas conjuntamente de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) (BOUMA et al., 2003). Existem duas principais formas definidas, a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (UC), sendo caracterizadas, respectivamente, por ulceração descontínua que afeta camadas mais profundas de qualquer porção do TGI e por inflamação e ulceração contínua da camada mais superficial do cólon (SCALDAFERRI et al., 2007).

Histologicamente, a inflamação na colite ulcerativa se restringe à camada mucosa colônica, sendo caracterizada pela infiltração de linfócitos, granulócitos e presença de abscessos nas criptas com infiltração de neutrófilos. Clinicamente a UC é caracterizada por períodos de recidiva e remissões, tendo como principais sintomas a diarreia, enterorragia, tenesmo, eliminação de muco e dor abdominal hipogástrica. Já a DC é caracterizada por infiltrado transmural que pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal com infiltração de linfócitos e formação de granulomas, podendo apresentar regiões afetadas entremeadas por zonas saudáveis (GEBOES et al., 2003). A DC acomete, com maior frequência, o íleo terminal e o cólon, iniciando-se tipicamente com crises de diarreia, febre, dor abdominal recorrente, geralmente periumbilical e emagrecimento. Na evolução do quadro clínico, podem surgir complicações locais e sistêmicas como alterações na arquitetura intestinal e até mesmo inflamações em outros órgãos, como na pele, em casos específicos (KJELDSEN et al., 1995). Além disso, as DII são doenças crônicas remitentes ou inflamatórias progressivas e estão associadas a um risco aumentado para o câncer de cólon (SCHIRBEL et al., 2010).

O aumento de casos de DII começou depois da segunda Guerra Mundial, época em que a doença era conhecida somente na América do Norte e norte da Europa. Desde então começou a ser diagnosticada com maior frequência na Europa Central e Ocidental, Japão, Austrália e, em seguida, na América do Sul e leste da Europa (KASER et al., 2010). A questão intrigante é como e por quais motivos a DII

Introdução

1 surgiu em novas áreas do mundo e nesse aspecto um grande número de fatores
2 pareciam estar envolvidos como tabagismo, dieta, contraceptivos orais,
3 apendicectomia, infecções e vacinas. Porém, com exceção do tabagismo, nenhum
4 dos outros fatores é atualmente apoiado por evidências diretas para serem
5 considerados verdadeiros (KASER et al., 2010) Neste contexto, a prevalência da DII
6 aumentou rapidamente nos países industrializados na segunda metade do século
7 XX, tendendo a se estabilizar neste período. A incidência da DC é de 5 casos/100
8 mil habitantes/ano nos Estados Unidos e Europa, com uma prevalência de 50/100
9 mil, enquanto na UC, esta é de 12/100 mil habitantes nos Estados Unidos
10 (ZALTMAN, 2007). Nos países em desenvolvimento, tais taxas estão em ascensão.
11 A DC e a UC foram consideradas raras nos países da América do Sul. As taxas de
12 prevalência, incidência e mortalidade no Brasil ainda são pouco conhecidas, apesar
13 de relatos regionais descreverem ocorrer em indivíduos geneticamente susceptíveis
14 por meio da interação com fatores ambientais ainda não totalmente compreendidos.
15 DII é considerada uma doença poligênica e familiar em 5-10% dos casos e
16 esporádica no restante (ZALTMAN, 2007). Estudos recentes reportaram aumento do
17 número de casos de DC, se comparados a UC no sudeste do Brasil, mais
18 especificamente no interior do Estado das Minas Gerais e em Ribeirão Preto no
19 Estado de São Paulo, (OLIVEIRA et al., 2010). Na macrorregião leste do Estado de
20 Minas Gerais, as internações por doenças inflamatórias intestinais representaram
21 0,6% das internações por doenças do aparelho digestivo de 1998 a 2005, o que
22 corresponde à situação de grande parte das demais macrorregiões de Minas Gerais.
23 Durante este mesmo período, foram registradas 363 internações hospitalares, em
24 razão das DII, distribuídas em 184 e 179 casos nos gênero masculino e feminino,
25 respectivamente (OLIVEIRA et al., 2010).

26

27 1.2 ETIOPATOGENIA

28

29 A etiologia das DII ainda não está totalmente elucidada; no entanto, é sabido
30 que trata-se de doenças multifatoriais nas quais interações entre os fatores

Introdução

1 genéticos, ambientais e desregulação do sistema imune contribuem para seu
2 desenvolvimento (MAYER, 2010).

3 Gêmeos monozigóticos apresentam concordância fenotípica em 50-75% dos
4 casos com DC e o risco relativo de desenvolvimento é 800 vezes maior em
5 comparação com a população geral (FIOCCHI, 2005). Na UC a concordância
6 fenotípica em gêmeos monozigóticos é menos freqüente (10-20%), sugerindo que a
7 hereditariedade é menos importante ou que variações no número e/ou diferenças
8 epigenéticas entre pares de gêmeos são mais freqüentes, limitando assim a
9 possibilidade de concordância (FIOCCHI, 2005). Atualmente mais de 60 variações
10 do gene NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*) também conhecido como
11 CARD15 (*caspase recruitment domain*) estão relacionadas com o desenvolvimento
12 da DII, especialmente DC (HELIO et al., 2010; 2003).

13 O produto desse gene NOD2 está relacionado com o reconhecimento de
14 uma estrutura denominada muramil dipeptídeo (MDP) que está presente na
15 membrana de bactérias gram-positivas e gram-negativas, o que gera subsequente
16 ativação de NF- κ B (fator de transcrição nuclear κ B) (OGURA et al., 2001). O
17 receptor NOD2 e os TLRs atuam sinergicamente no reconhecimento de bactérias
18 intestinais e na ativação da resposta imune na DII (ISHIHARA et al., 2009;
19 SIEGMUND et al., 2011). Dessa forma, a mutação em NOD2 leva ao não
20 reconhecimento de MDP e ao aumento da quantidade de bactérias gram-positivas e
21 gram-negativas no intestino de camundongos geneticamente deficientes de NOD2
22 em comparação com animais selvagens, além de redução do número de criptas
23 intestinais (PETNICKI et al., 2009). Alguns autores descreveram que a variação
24 1007fs, que aumenta 17,1 vezes a chance de desenvolvimento de DC na região do
25 íleo (HELIO et al., 2003; ISHIHARA, et al., 2009), é a mais observada nesses
26 pacientes e está relacionada com a deficiência em induzir a ativação de NF- κ B
27 mediada pelo LPS. Outros pesquisadores constaram que pacientes com mutação de
28 NOD2 tem diminuição de bactérias probióticas intestinais (SOKOL et al., 2008).

29 Além de fatores genéticos, a possibilidade de que a DII é uma doença
30 dirigida contra agentes microbianos tem sido considerada desde seus relatos iniciais
31 (ROLHION et al., 2007). Camundongos “*germ-free*” não desenvolvem DII

Introdução

1 experimental independentemente do método de indução dessa inflamação (Elson,
2 Cong *et al.* 2005), sugerindo que a ausência de microorganismos na mucosa
3 intestinal faz com que o sistema imune não seja estimulado devido à falta de
4 antígenos. Por outro lado, pacientes com DII, especialmente DC, apresentam
5 anticorpos contra antígenos bacterianos e fúngicos incluindo *Saccharomyces*
6 *cerevisiae* (ASCA), membrana externa de porina da *Escherichia coli* (OMPC) e
7 *Pseudomonas fluorescens* (MOW *et al.*, 2004). Há também aumento de bactérias
8 patogênicas e diminuição das bactérias probióticas, tais como *Bifidobacterium* e
9 *Lactobacillus ssp* no trato gastrointestinal na DII (COHEN, 2000; 2011). Além disso,
10 terapias antibacterianas usadas como adjuvantes podem inibir microorganismos
11 capazes de desencadear uma resposta imune excessiva e melhorarem a inflamação
12 local (SOMERVILLE *et al.*, 1985). Na DC, as bactérias anaeróbicas gram positivas
13 (*Streptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus productus*, *Coprococcus comes*,
14 *Eubacterium contortum*) e gram-negativas (*Bacteroides*, *Fusobacterium*) estão
15 aumentadas (SARTOR, 2008). Na UC, por sua vez, foram descritas bactérias cujos
16 produtos metabólicos são agressivos à mucosa intestinal, como a hialuronidase e a
17 indução produção de citocinas, dentre outros (SARTOR, 2008). Esses achados
18 estabeleceram uma ligação estreita entre a magnitude da resposta imunológica
19 contra antígenos entéricos e a patogênese da DII (SCHIRBEL *et al.*, 2010).

20 Neste contexto de interações multifatoriais na etiopatogenia das DII, a
21 resposta imunológica exerce papel fundamental no desencadeamento da doença. A
22 homeostase intestinal requer uma resposta imune controlada contra a microbiota,
23 (PARK *et al.*, 2005), o que contribui para a tolerância. Porém, quando este processo
24 é desregulado, a DII é desencadeada.

25 Além de receptores de reconhecimento padrão presentes nas células do
26 sistema imunológico e células epiteliais do intestino (Park, Li *et al.* 2005),
27 componentes da imunidade inata e adaptativa como os neutrófilos, macrófagos,
28 células *natural killer*, mastócitos, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ também estão
29 envolvidos no desenvolvimento da DII (NEUMAN, 2007; MAYER, 2010). Em
30 condições fisiológicas, macrófagos são condicionados pelo microambiente das
31 mucosas para expressar fenótipo não inflamatório traduzido por baixa expressão de
32 receptores de imunidade inata e produção limitada de citocinas pró-inflamatórias

Introdução

1 (SMITH et al., 2005). Em contraste, na DII macrófagos exibem um fenótipo ativado e,
2 com isso, após o recrutamento a partir do sangue periférico estão preparados para a
3 produção de várias citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para a produção
4 de IFN- γ por células T no local da inflamação (KAMADA et al., 2008). Há também
5 participação de células dendríticas que ativam linfócitos CD4 e CD8 efetores
6 juntamente com o aumento da produção de citocinas como IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-12,
7 IL-6 e IL-18 (NEUMAN, 2007). O TNF- α em associação com IFN- γ pode induzir
8 apoptose de células produtoras de muco contribuindo para alterações da barreira
9 epitelial e perpetuação da resposta inflamatória (ROUND et al., 2009). Em adição, a
10 IL-1 β , TNF- α e IFN- γ estimulam a produção de quimiocinas e moléculas de adesão,
11 que auxiliam no recrutamento de mais células inflamatórias para o intestino, criando
12 assim condições para amplificação da cascata inflamatória, secreção de mais
13 mediadores, enzimas e radicais livres que destroem o tecido (ROUND et al., 2009).

14 Pacientes que apresentam alterações na imunidade inata com aumento
15 crítico de uma série de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 tem maior
16 incidência de DII (CANTO et al., 2006). Porém, o sistema imune adquirido,
17 especialmente linfócitos T, tem sido fortemente relacionado à patogênese dessas
18 doenças (MAYER, 2010). Neste contexto, a combinação de efeitos sobre células
19 imunes (recrutamento e estimulação) e células endoteliais (ativação por estímulo de
20 síntese de moléculas de adesão E- selectina e ICAM-1) conduz ao recrutamento de
21 monócitos e linfócitos T ativados para a mucosa intestinal e formação de granulomas
22 na DII (ROUND, 2009).

23 Estudos da década de 90 reforçaram a visão de que a inflamação na DC
24 estava associada à resposta Th1 uma vez que tecidos lesados produziam grande
25 quantidade de IFN- γ e baixa quantidade de IL-4. Esta evidência foi confirmada por
26 trabalhos que mostravam que as células apresentadoras de antígenos (APCs)
27 isoladas da lâmina própria do intestino de pacientes com DC tinham a produção de
28 IL-12 aumentada, induzindo a diferenciação de células Th1 produtoras de IFN- γ e
29 TNF- α (MONTELEONE et al., 1997). Pesquisadores demonstraram também que
30 lesões de DC contêm fatores de transcrição como T-bet ativados aumentando
31 diretamente a produção de IFN- γ (NEURATH et al., 1995).

Introdução

1 Sendo assim, com base na evidência de aumento da produção de IFN- γ , a
2 DC é considerada uma condição Th1, (ATARASHI et al., 2008). Em contraste, a UC
3 representa uma resposta Th2 atípica no cólon, com secreção de IL-13 por células T
4 efectoras no cólon que medeiam citotoxicidade e apoptose celular (MANOCHA et al.,
5 2009). Células Th2 polarizadas produzindo IL-5 estão também presentes na UC.
6 Sendo assim, o equilíbrio entre Th1 e Th2 tem sido utilizado para diferenciar UC e
7 DC (SCHIRBEL et al., 2010). No entanto, células de padrões adicionais de resposta
8 imune foram recentemente descritas, incluindo as Th17, que produzem a citocina
9 pró-inflamatória IL-17, presente em níveis aumentados na mucosa inflamada de
10 ambas DC e UC (MONTELEONE et al., 2011). Logo, embora na maioria dos casos o
11 acúmulo de células T não seja a única causa de DII, há evidências de que a
12 desregulação de respostas entre células T efectoras e reguladoras perpetue a
13 doença.

14 Sob condições normais, em comparação com outros tecidos, a lâmina própria
15 intestinal tem maior proporção de células T reguladoras (Tregs) CD4⁺ que
16 desempenham a função de modular respostas imunológicas contra alimentos e
17 microbiota comensal (SALEH et al., 2011). As Tregs desempenham papel crítico na
18 manutenção da homeostase, limitando respostas autoimunes, especialmente no
19 intestino (HIMMEL et al., 2012). Há evidências de que a falta de Tregs leva à DII.
20 Pacientes com Tregs não funcionais ou ausentes têm grave inflamação intestinal
21 (BACCHETTA et al., 2006). Da mesma forma, camundongos que não possuem
22 Tregs ou citocinas agonistas como IL-10, IL-35 e em alguns casos o TGF- β
23 desenvolvem colite grave (KONKEL et al., 2011).

24 Nos últimos anos, o estudo em modelos animais de inflamação de mucosa
25 levou a significativos avanços na compreensão de DII em humanos (STROBER et
26 al., 2002). A colite induzida por enema de TNBS (ácido 2,4,6 Trinitrobenzeno
27 Sulfônico) ocorre após a destruição da mucosa com etanol (HIBI et al., 2002). A
28 susceptibilidade ao TNBS varia de um camundongo para outro, podendo levar à
29 formação de granulomas com infiltração de células inflamatórias em todas as
30 camadas do intestino (NEURATH et al., 1995). A administração de DSS (dextran
31 sulfato de sódio) na água de camundongos ou ratos provoca perda de peso corporal
32 e colite aguda com infiltração de neutrófilos (OKAYASU et al., 1990). Boirivant

1 relatou que enema com oxazolona e etanol indiziria colite, acompanhada por úlceras
2 no cólon distal (BOIRIVANT et al., 1998). Sendo assim, com base nesses e em
3 outros estudos, sabe-se que a resposta Th1 excessiva é demonstrada
4 experimentalmente na colite induzida por TNBS (HELLER et al., 2002) e por DSS,
5 sendo que o aumento de resposta Th2 pode ser vista em modelos de inflamação
6 intestinal utilizando Oxazolona (BOIRIVANT et al., 1998). Alex P et al., 2009,
7 demonstraram que colite crônica induzida por TNBS apresenta também IL-17
8 aumentada (ALEX et al., 2009), assim como este fato pode ser observado em
9 modelos agudos (KIM et al., 2011) sugerindo que a inflamação experimental do
10 cólon está relacionada com resposta dos padrões Th1 e Th17. Além disso, na
11 inflamação experimental também há redução na quantidade ou função de Tregs,
12 mimetizando assim a DC humana (DEJACO et al., 2000)

13 Em resumo, a DII caracteriza-se por um microambiente de citocinas pró-
14 inflamatórias com geração de Th1, Th2, Th17 e Tregs, fazendo com que o balanço
15 da resposta imunológica determine a progressão ou controle da doença. Dessa
16 forma, sendo a resposta imunológica mediadora da inflamação, compreender a sua
17 função no TGI e sua modulação na DC e UC se torna fundamental tanto para
18 desvendar os complexos mecanismos de inflamação do intestino, como para instituir
19 novas modalidades terapêuticas para essas doenças.

20

21 1.3 TRATAMENTO

22

23 A terapêutica rotineiramente utilizada para a DII inclui um grande número de
24 fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os
25 imunossupressores e imunomoduladores (HANAUER et al., 1994). Essas drogas,
26 em especial os imunobiológicos, têm como alvo mediadores inflamatórios,
27 principalmente o TNF- α , citocina pró-inflamatória, abundante no intestino de
28 pacientes com DII (ANAND et al., 1999).

29 Entretanto, os tratamentos disponíveis não representam a cura da DII,
30 sendo que os fármacos atualmente utilizados podem induzir sérios efeitos colaterais

Introdução

1 e/ou são de alto custo. Estes aspectos limitam sua utilização, além de existirem
2 indivíduos que não respondem a nenhuma terapia farmacológica existente (ANAND
3 et al., 1999) e que precisam ser submetidos a repetidas cirurgias, as quais possuem
4 sérias consequências para a qualidade de vida dos pacientes. Assim sendo, estes
5 fatores em conjunto à suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer cólon-retal por
6 pacientes com DII (GUAGNOZZI et al., 2012) justificam a busca por novas
7 modalidades terapêuticas para DC e UC.

8 As células-tronco são uma grande promessa como fonte de material para
9 novas terapias não invasivas com a finalidade de tratar uma variedade de doenças
10 (CARRION et al., 2010). As células-tronco adultas têm sido isoladas, com grande
11 sucesso, de inúmeros tecidos e na maioria dos casos foi comprovado seu potencial
12 de diferenciação em diferentes linhagens celulares. Alguns exemplos são células-
13 tronco hematopoiéticas, células-tronco neurais, células-tronco do músculo
14 esquelético e células-tronco mesenquimais (MSC) (SINGER et al., 2011).

15 As células-tronco mesenquimais ou células mesenquimais estromais (MSC)
16 existem em quase todos os tipos de tecidos com a finalidade de substituir células
17 que são perdidas por envelhecimento normal, lesão ou doença. Estas células têm
18 sido isoladas de medula óssea, músculo, gordura, cérebro, coração, pele e sangue
19 do cordão umbilical. Na medula óssea as MSC fazem parte do estroma que sustenta
20 a hematopoese, o que representa 1 em 10 000 células nucleadas (CHAMBERLAIN
21 et al., 2007) As MSC são capazes de dar origem a adipócitos, condrócitos e
22 osteoblastos (SINGER et al., 2011), além de possuírem capacidade de formar
23 depósitos cálcio e cartilagem (FRIEDENSTEIN et al., 1970). Seu potencial de
24 diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos é observado quando as células
25 são cultivadas em meios de cultura contendo fatores específicos para essa
26 diferenciação (DOMINICI et al., 2006).

27 Morfologicamente, as MSC são células fusiformes, com formato semelhante
28 a fibroblastos e que possuem a capacidade de aderência a plásticos ou a outros
29 componentes da matriz extracelular. Logo, existem métodos para isolar as MSC, que
30 se baseiam nessas características físico-químicas de adesão a diversos substratos.
31 Estas células são heterogêneas, com potencial de crescimento variável, embora

Introdução

1 apresentem marcadores de superfície semelhantes (BAKSH et al., 2007).
2 Fenotipicamente, elas são negativas para marcadores de superfície hematopoéticos,
3 leucocitários e endoteliais como CD34, CD45, CD55, CD13 (DING et al., 2004).
4 Existem algumas diferenças entre fenótipos de MSC humanas e murinas. Por
5 exemplo, CD34 pode ser expresso em MSC murinas e podem não ser expressos em
6 huMSC, já CD90 pode não ser expresso em MSC de camundongo e ser em huMSC
7 (PEISTER et al., 2004).

8 As MSC possuem capacidade de regular inflamação pelo contato célula-
9 célula ou pela expressão de vários fatores solúveis. Em geral, seus efeitos
10 imunomoduladores consistem na inibição de proliferação de linfócitos CD4⁺, CD8⁺,
11 células NK (natural killer), supressão da produção de imunoglobulinas, inibição da
12 maturação de células dendríticas e a estimulação e proliferação de células T
13 reguladoras (KRAMPERA et al., 2006). Ao longo dos últimos anos, muitos estudos
14 têm demonstrado que vários fatores solúveis produzidos pelas MSC estão
15 relacionados com seus efeitos imunossupressores parácrinos, sendo que moléculas
16 bioativas são, supostamente, o principal mecanismo pelo qual as MSC alcançaram
17 seu efeito terapêutico (SINGER et al., 2011). Muitas dessas moléculas, como a
18 prostaglandina E2 (PGE2), antígeno leucocitário humano (HLA-G), TGF- β , fator
19 inibidor de leucemia (LIF), IL-10 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), contribuem
20 para esse efeito (KLYUSHNENKOVA et al., 2005), atuando como responsáveis pela
21 inibição da proliferação e diferenciação de células imunes (BASSI et al., 2011). Foi
22 mostrado que em um ambiente pró-inflamatório MSC derivada de MO murina
23 expressam constitutivamente baixos níveis de COX-2, PGE-2, TGF- β e altos níveis
24 de IL-10 e PD-1, sendo estas MSC capazes de reduzir significativamente a
25 proliferação de aloantígenos (ENGLISH et al., 2008).

26 Com base nessas características de regulação de resposta imunológica, as
27 MSC tem sido utilizadas na modulação da inflamação resultante de lesão causada
28 por transplantes alogeneicos de órgãos sólidos ou por doenças autoimunes
29 (GONZALEZ et al., 2009). Este fato, aliado ao seu fácil isolamento e extensivo
30 potencial de diferencial, colocaram estas células entre as primeiras células-tronco a
31 serem utilizadas na prática clínica (KASSEM, 2004), especialmente no tratamento de
32 doenças autoimunes. Atualmente são empregadas em mais de cem ensaios clínicos

Introdução

1 e em diversos estudos pré-clínicos (LI et al., 2012) como em leucemias (Le Blanc,
2 Frassoni *et al.* 2008), DII (GONZALEZ et al., 2009), diabetes (LEE et al., 2006) e
3 artrite reumatóide (KASTRINAKI et al., 2008), para comprovação de sua eficácia
4 nessas doenças.

5 Neste contexto, até o momento, vários trabalhos têm documentado de forma
6 categórica melhorias na clínica de modelos animais com DII (GONZALEZ et al.,
7 2009), isquemia cerebral, diabetes (Lee, Seo *et al.* 2006), entre outros, após
8 tratamento com MSC. Em geral, os autores sugerem que essas células podem ser
9 capazes de migrar para o sítio da inflamação, onde exercem papel imunorregulador
10 e regeneração tecidual, o que pode levar à remissão da doença. Entretanto, os
11 mecanismos que levam a estas ações ainda não foram completamente elucidados
12 (SINGER et al., 2011).

13 Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa e colaboradores
14 apontaram que camundongos com DII experimental imunossuprimidos com
15 radioterapia ou ciclofosfamida e tratados com transplante total de medula óssea
16 conseguiram ganho de peso e aumento da sobrevivência se comparado com os animais
17 doentes e submetidos apenas à imunoablação, demonstrando o papel essencial que
18 o transplante total de medula óssea exerceu na reconstituição da resposta
19 imunológica dos animais. Porém, a grande melhora clínica do quadro da colite
20 ocorreu devido à intensa imunossupressão à qual estes animais foram submetidos e
21 não ao transplante propriamente dito (GODOI et al., 2010; 2012). Neste contexto,
22 tornou-se evidente a necessidade de novas terapias que fossem capazes de, ao
23 mesmo tempo, suprimir intensamente a resposta efetora prejudicial ao organismo na
24 DII e não oferecer riscos inerentes à imunoablação total, o que aumentaria o risco de
25 mortalidade daqueles submetidos a tais tratamentos. Logo, sendo as MSC
26 constituintes da própria medula óssea e importante fonte de terapia
27 imunomoduladora, nosso grupo passou a estudar os efeitos do transplante de MSC
28 e os mecanismos pelos quais estas células podem exercer o controle da inflamação,
29 como pela produção óxido nítrico (NO), na DII experimental.

30

1.4 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso de meia-vida relativamente curta, gerado pela família de proteínas óxido nítrico sintase (NOS) e que atua como molécula sinalizadora, mediando a comunicação célula–célula (MONCADA, 1999). Enzimaticamente, NO é gerado em mamíferos a partir da oxidação de L-arginina para L-citrulina. Também pode ser formado independentemente da NOS pela redução de nitrato e nitrito catalizada por enzimas redutoras, tais como desoxihemoglobina e nitrato redutase (BRENNAN et al., 2000).

Três isoformas da NOS foram identificadas, sendo duas presentes constitutivamente nas células, que são a eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), enquanto que outra isoforma é expressa após a produção de certas citocinas ou produtos bacterianos, e é assim chamada de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (STUEHR et al., 1992). Assim sendo, temos NOS tipo I ou nNOS, que é encontrada em populações específicas de neurônios no cérebro; NOS tipo II, ou NOS induzível (iNOS), pode ser induzida em macrófagos após estímulos inflamatórios ou NOS tipo III chamada de NOS endotelial (eNOS), que é encontrada em células endoteliais. A nNOS e eNOS são semelhantes, na medida em que são geralmente produzidas constitutivamente e a sua atividade é regulada por concentrações de cálcio intracelulares. Em contraste, a indução da expressão de iNOS ocorre por estímulos inflamatórios tais como o TNF- α ou IFN- γ (HUANG et al., 2000).

NO age também como um controlador das respostas Th1/Th2, participa nas reações de estresse oxidativo e das respostas apoptóticas. Em adição, é um importante mediador citotóxico de leucócitos ativados e tem um importante papel na modulação da resposta imune (CHO et al., 2004), proliferação, regulação vascular, reações inflamatórias, plasticidade sináptica, contratilidade cardíaca, respiração mitocondrial, entre outras (NATHAN, 1992).

Sob condições patológicas (por exemplo, durante a inflamação), elevados níveis de NO são produzidos no organismo após a indução da expressão da iNOS (NOS-II). Por um lado, este mediador pode exercer efeitos benéficos agindo como

Introdução

1 um anti-bacteriano (CHEN et al., 2012), anti-parasitário (AMORIM et al. 2012),
2 agente anti-viral (LIAO et al., 2012) ou como um agente anti-tumoral (SHAKED et al.,
3 2012). Em contrapartida, os níveis elevados de NO, se não controlados, podem ser
4 prejudiciais, uma vez que o NO pode reagir com o superóxido concomitantemente
5 produzido, o que gera compostos altamente tóxicos para a estrutura celular, como o
6 peroxinitrito (BECKMAN et al., 1996).

7 A expressão da iNOS desempenha papel importante na patogênese das DII.
8 Níveis colônicos de NO em pacientes com DII em fase ativa são de dois a cinco
9 vezes maiores do que em pacientes saudáveis ou em remissão (RACHMILEWITZ et
10 al., 1998). Além disso, foi descrita uma maior expressão de genes que regulam
11 positivamente a produção de NO em pacientes com DC e UC (GILLBERG et al.,
12 2012). Porém, por outro lado a iNOS contribui para distintas funções que MSC
13 podem exercer na imunorregulação, mostrando um amplo espectro e interações com
14 células do sistema imune (SINGER et al., 2011). NO é produzida por MSC após
15 estimulação via IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (REN et al., 2008). Além disso, foi observado
16 que as MSCs produzem NO quando se diferenciam em condrócitos (MAIS et al.,
17 2006).

18 O NO produzido pelas MSCs tem-se mostrado importante para a supressão
19 de célula T (MAZZONI et al., 2002). Sato et al, 2007, demonstraram que a
20 fosforilação da STAT-5 nas células T é suprimida na presença de MSC e que o NO
21 está envolvido nesse processo, uma vez que MSC provenientes de camundongos
22 iNOS^{-/-} tinham reduzida capacidade de suprimir a proliferação de células T (SATO et
23 al., 2007). MSC derivadas de camundongos iNOS^{-/-} conseguem atrair células T para
24 o local da inflamação, mas não podem induzir a imunossupressão, o que pode gerar
25 resposta do enxerto versus hospedeiro (GVHD) devido a inflamação causada pelas
26 células T (SATO et al., 2007). Assim, em camundongos, a produção de NO é
27 necessária para supressão da resposta imune patológica *in vivo* (SINGER et al.,
28 2011). Por outro lado, estudos de Ren et al. revelaram que o efeito imunossupressor
29 das MSC depende da presença de IFN- γ , TNF- α , IL-1 α ou IL-1 β . Essas citocinas
30 levam as MSC a expressarem iNOS e grandes quantidades de quimiocinas. Estas
31 quimiocinas, por sua vez, complementam a atividade de NO em co-cultura e *in vivo*,
32 por induzirem células T a migrarem para locais próximos das MSC, onde os níveis

Introdução

1 elevados de NO suprimem as células T. Com humanos e primatas não humanos
2 MSC têm um aspecto semelhante de produção de quimiocina, mas eles utilizam e
3 enzima indoleamina 2, 3 dioxigenase (IDO) em vez de NO para suprimir a função de
4 células T (REN et al., 2010).

5 Assim sendo, apesar de já provado que várias moléculas estão envolvidas na
6 supressão da resposta imunológica realizada por MSC, ainda são necessárias
7 pesquisas para elucidar os reais mecanismos pelos quais as MSC exercem este
8 papel e qual o efeito de cada molécula envolvida nesse processo. Por outro lado,
9 vários pacientes com DC ou UC ainda não respondem aos tratamentos atualmente
10 disponíveis e as opções terapêuticas oferecidas para estes casos têm sido cada
11 vez mais invasivas. Logo, como as MSC consistem em uma modalidade terapêutica
12 promissora, este estudo pré-clínico teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico
13 de MSC alogênicas na DII e o papel do NO na supressão da resposta imunológica *in*
14 *vivo*.

2 OBJETIVOS

1 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL:

2

3 Avaliar o potencial terapêutico do transplante alogênico de células
4 mesenquimais estromais e do óxido nítrico na modulação da doença inflamatória
5 intestinal induzida experimentalmente.

6

7 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

8 1. Isolar MSC da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e
9 C57BL/6 iNOS^{-/-} e realizar sua caracterização fenotípica e funcional.

10 2. Avaliar, por análise clínica e histopatológica, o desenvolvimento
11 da inflamação intestinal de camundongos com colite induzida
12 experimentalmente, tratados ou não com MSC de animais WT e iNOS^{-/-}.

13 3. Estudar a modulação da resposta imune intestinal por meio da
14 avaliação do infiltrado inflamatório e da produção de citocinas em animais
15 com colite tratados ou não com MSC de animais WT e iNOS^{-/-}.

16 .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para indução de colite e estudo do potencial terapêutico de MSC, foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, entre 6 e 8 semanas de idade, com a doença ou controles, receptores do transplante de MSC, criados e mantidos no biotério da disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Como doadores foram utilizados camundongos C57BL/6 *wild type* (WT – selvagens) ou deficientes da enzima óxido nítrico sintase induzível (C57BL/6 iNOS^{-/-}), criados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP) e mantidos no biotério da disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais receberam água e comida *ad libitum* durante todo o experimento. Foram utilizados 5 animais por grupo para cada período estudado, assim divididos: grupo 1, camundongos controles, sem indução de colite que receberam PBS por via intrarretal; grupo 2, camundongos controles que receberam o veículo da droga indutora da colite (etanol); grupo 3, camundongos com colite que receberam ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico por via intrarretal (TNBS); grupo 4 camundongos com colite tratados com infusão de MSC provenientes de camundongos C57BL/6 WT e grupo 5 camundongos com colite tratados com infusão de MSC provenientes de camundongos C57BL/6 iNOS^{-/-}. Todos os procedimentos de experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFTM.

3.2 COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO 2, 4,6-TRINITROBENZENO SULFÔNICO (TNBS)

Camundongos foram deixados em jejum por 12h, mantidos com solução de glicose (0,03g/mL). Após as 12h foram anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal e submetidos à injeção intrarretal de ácido 2, 4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, Sigma-Aldrich, Steinhein, GE) na dose de 175mg/Kg de peso corporal, utilizando-se etanol 50% como veículo da droga (para quebrar a barreira intestinal), em solução de PBS pH

1 7.4. Para realizar este procedimento, uma seringa de 1 ml contendo a solução de
2 TNBS foi acoplada a um cateter de 3,5F, cuja ponta foi mergulhada em vaselina e
3 cuidadosamente inserida no colón dos animais até cerca de 4 cm distal ao ânus.
4 Após a injeção, os animais foram mantidos de cabeça para baixo por 60 segundos
5 para melhor distribuição da solução pós-enema. Os camundongos foram pesados
6 diariamente e avaliados quanto à presença dos sinais clínicos da doença como
7 diarréia, sangramento, pêlo eriçado e hipoatividade.

8

9 3.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE 10 CAMUNDONGO

11

12 Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, fêmeas, foram
13 eutanasiados por deslocamento cervical. Logo a seguir, os 02 fêmures, as 02 tíbias
14 e os 02 úmeros de cada animal foram removidos, limpos com lâmina de bisturi e
15 colocados numa placa de petri contendo solução de RPMi 1640 (GIBCO BRL, Grand
16 Island, EUA) incompleto, sob gelo. Os ossos então foram levados à câmara de fluxo
17 laminar e suas extremidades inferiores foram cortadas com tesoura esterilizada.
18 Aproximadamente 5 ml de solução de meio de cultura RPMI 1640 completo (GIBCO
19 BRL, Grand Island, EUA) contendo 5% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand
20 Island, EUA) foram injetados nas extremidades ósseas para remoção do conteúdo
21 medular, que foi coletado em tubos de 50 ml. Os mesmos foram em seguida
22 centrifugados a 4°C, 10 min, 677 x g e as células obtidas contadas com corante Azul
23 de Tripán a 0,2% em câmara de Neubauer.

24

25 3.4 CULTURA DAS MSC WT E INOS^{-/-}

26

27 Após a centrifugação das células obtidas da medula óssea, o *pellet* foi
28 ressuspensionado em meio DMEM alta glicose (GIBCO BRL, Grand Island, EUA)
29 enriquecido com 10% soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, EUA). Foram
30 colocados 20 ml de meio DMEM a 1×10^6 células por ml em cada garrafa de 75cm²
31 para cultura. Após 24h, as células não-aderentes foram removidas, juntamente com

1 os 20 ml de meio e foram adicionados 20 ml de meio de cultura. Estas foram
2 mantidas em atmosfera umidificada a 37°C, com 5% de CO₂. O meio de cultura foi
3 trocado duas vezes na semana, durante duas semanas aproximadamente.

4 As células foram analisadas ao microscópio invertido e, quando atingiam
5 uma confluência de 80-90%, eram replaqueadas. Para tal, foram incubadas com
6 Tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO BRL, Grand Island, EUA) por 4 minutos a 37°C,
7 seguidas por desativação com RPMI enriquecido de SBF 5%. As células foram
8 então cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com RPMI 5% SBF e
9 repicadas para a 1^a passagem, quando foram colocadas 1,5x10⁶ células por garrafa.
10 Este procedimento foi repetido por até quatro passagens, quando as células foram
11 utilizadas para os experimentos de transplante, caracterização imunofenotípica e
12 diferenciação em adipócitos e osteócitos. Uma parte das células não utilizadas
13 nesses procedimentos foi congelada. O congelamento foi realizado em solução
14 específica contendo soro fetal bovino e 10% de DMSO, sendo a estocagem
15 realizada em freezer -70°C e posteriormente nitrogênio líquido.

16

17 3.5 IMUNOFENOTIPAGEM DE MSC

18

19 Alíquotas de MSC a 1x10⁶ células/ml foram incubadas por 20 minutos a
20 temperatura ambiente no escuro com anticorpos monoclonais ou isotipos controle
21 diretamente conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou
22 ficoeritrina (PE). Foram feitas marcações simples ou duplas para a análise dos
23 diversos marcadores de MSC. Após a incubação, as células foram centrifugadas por
24 5 minutos a 500 x g, lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 200 µl de PBS
25 e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson,
26 San Jose, CA). Foram adquiridos 20000 eventos/amostra com base nos parâmetros
27 de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). As análises foram realizadas utilizando-
28 se o *software Cellquest* (BD Becton Dickinson, San Jose, CA. Para a caracterização
29 imunofenotípica das MSCs foram utilizados os anticorpos monoclonais contra os
30 marcadores CD45, CD51, CD54, CD44, CD49, CD31, CD166, CD34, CD13, CD146,
31 CD29 e CD90. Para análise, foi desenhada uma *gate* na população de células

1 viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e
2 granularidade (SSC). Os eventos da *gate* e células viáveis (R1) foram representados
3 por um histograma de fluorescência 1 (FL1, FITC) ou de fluorescência 2 (FL2, PE).
4

5 3.6 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS MSCS

6

7 Na quarta passagem, as MSCs foram induzidas à diferenciação em
8 adipócitos e osteócitos. Alíquotas de 1 ml contendo 40.000 células (diferenciação em
9 adipócitos e osteócitos) ou 5.000 células (controle) foram cultivadas em placas de 24
10 poços com lamínulas. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início
11 do cultivo, quando a aderência e confluência estavam em torno de 50%. Neste
12 momento, todo o meio de cultura foi removido e adicionado 1 ml de meio de indução
13 (adipócitos ou osteócitos) ou somente o meio DMEM 15% SFB como controle. As
14 placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2
15 vezes por semana. O meio utilizado para troca continha o dobro da concentração
16 dos agentes indutores. As células foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ até a
17 diferenciação celular e monitoradas no microscópio invertido. Para diferenciação em
18 adipócitos, foi utilizado meio DMEM 15% SBF, enriquecido com 10 µM de
19 dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 10 µg/mL de
20 insulina (Sigma-Aldrich, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis,
21 MO, EUA). Para diferenciação em osteócitos, foi utilizado meio DMEM 7,5% SBF
22 enriquecido com 0,10 µM de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Brasil),
23 100 µM de ácido ascórbico e 10 mM de β glicerolfosfato (Reagem, Brasil).
24
25

26 3.7 INFUSÃO DE MSC

27

28 Primeiramente as células MSC provenientes de camundongos C57BL/6 WT
29 foram infundidas nas concentrações de 0,25 x 10⁶; 0,5x10⁶; 1x10⁶; 2x10⁶ ou 3x10⁶
30 por animal, para avaliar a quantidade ideal para o tratamento.

1 Em seguida, após a definição da melhor quantidade, as MSC provenientes
2 de camundongos C57BL/6WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-} foram infundidas nos animais, por
3 via intraperitoneal, 24 horas após a indução da colite (1×10^6 MSC por animal). Para
4 evitar formações de grumos celulares e assegurar uma distribuição uniforme, as
5 MSC foram ressuspensas em um volume adequado de solução PBS acrescido de
6 1mg/mL de *Pulmozyme* (ROCHE, South San Francisco, EUA). Posteriormente à
7 indução da doença, os camundongos foram monitorizados diariamente em relação
8 ao peso e presença de sinais clínicos como diarreia, sangramento, hipoatividade e
9 pêlo eriçado em todos os grupos.

11 3.8 ESCORE CLÍNICO E SOBREVIDA NA DII

13 Os animais com colite que receberam ou não o transplante das MSC foram
14 avaliados quanto à presença de sinais clínicos da doença, como perda de peso,
15 diarreia, sangramento retal, hipoatividade, pêlo eriçado e diarreia sanguinolenta. A
16 morte nos sete primeiros dias pós-indução de DII e tratamento também foi avaliada.
17 Para esta avaliação, foi utilizado um critério de pontuação, no qual cada sinal
18 apresentado pelo animal corresponderia a 1 ponto, sendo que a morte do animal
19 não seria contada, pois isso já seria avaliado em um gráfico de sobrevida. Por fim,
20 foi realizada a soma de todos os valores de cada animal individualmente, sendo
21 estes dados apresentados graficamente, assim como o índice de
22 mortalidade/sobrevida na presença ou ausência de tratamento com MSC.

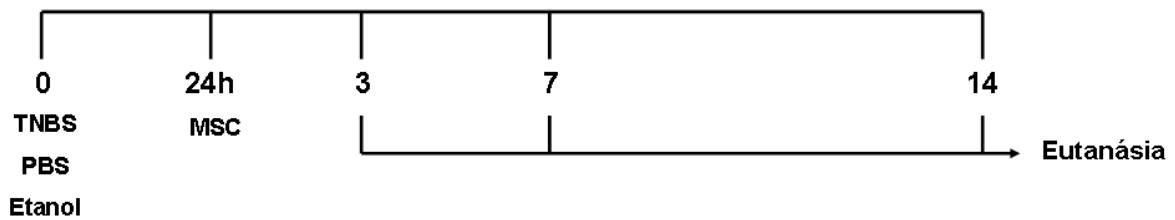
24 3.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

26 Os camundongos foram eutanasiados nos dias 3, 7 e 14 após a indução da
27 colite e infusão das MSC, conforme Figura 1. Intestino, baço e linfonodos
28 mesentéricos foram coletados para as análises posteriores. Amostras de sangue
29 periférico foram coletadas do plexo retro-orbital dos camundongos para contagem
30 total de células em câmara de Neubauer e confecção de esfregaço para coloração
31 de Panótico Rápido LB (Laborclin, Pinhais/PR Brasil) e posterior contagem

1 diferencial de leucócitos. Amostras de cólon foram coletadas e imersas em
 2 PBS/formaldeído 10% para inclusão em parafina ou foram congeladas diretamente
 3 em nitrogênio líquido para trituração e dosagem de citocinas e enzimas nos
 4 homogeneizados de tecidos.

5

6 **Figura 1 - Esquema de indução de colite por TNBS, infusão de PBS e etanol,**
 7 **com posterior eutanásia dos mesmos para coleta das amostras.**



8

9

10 3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

11

12 A avaliação histológica foi realizada através da coloração com hematoxilina
 13 e eosina (HE) e de Ácido Periódico Schiff (P.A.S. EasyPath, Milão, Itália.). Os
 14 tecidos de cólon coletados foram deixados em formaldeído por 24h e depois
 15 passados para etanol 70%. Após esse processo, os tecidos destinados à análise
 16 histológica foram colocados em álcool 95% por 10 minutos, sendo que este processo
 17 foi realizado por três vezes. Em seguida, foram colocadas em xilol e deixadas por 10
 18 minutos, repetindo por duas vezes essa etapa e posteriormente passadas duas
 19 vezes na parafina líquida a 60 °C, onde foram deixados por 10 minutos em cada.
 20 Após este processamento, o bloco de parafina contendo o tecido era confeccionado.

21

22 Posteriormente ao processamento histológico e inclusão em parafina, foram
 23 realizados cortes de 5µm de espessura no micrótomo e foram confeccionadas as
 24 lâminas. A presença de infiltrado inflamatório, edema e ulcerações foram avaliados
 25 utilizando microscópio óptico acoplado a sistema de captação de imagens. Em
 26 seguida o infiltrado inflamatório foi quantificado através da contagem de células da
 27 lâmina própria coradas com HE por área nas imagens capturadas. Essa contagem
 foi realizada através do programa Image J, tendo sido analisados 20 quadrantes da

1 imagem de cada animal que somadas constituíram 0,08 mm² de área analisada.
2 Com isso o resultado final da imagem de cada animal se baseou na somatória do
3 número de células da lâmina própria dividida pelo valor da área total. Esse valor que
4 expresso em mm² foi plotado em um gráfico representativo. Para verificar a
5 densidade das células caliciformes e existência ou ausência úlceras ou erosões,
6 foram capturadas imagens das lâminas coradas com PAS, também foi utilizado o
7 programa Image J que formava vinte quadrados em cada imagem e em cada
8 quadrado cem pontos, onde era quantificado cada ponto que caíam nas células
9 caliciformes e também os pontos que caíam nas áreas com ausência de tecido da
10 mucosa intestinal, chamados de pontos brancos, ao fim da contagem esses valores
11 eram plotados para um gráfico, e eram multiplicados por cem, para termos o valor
12 em porcentagem.

13

14 3.11 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

15

16 Para avaliação de alterações sistêmicas induzidas pós-transplante com
17 MSC, foi coletado sangue periférico dos camundongos eutanasiados nos dias 3, 7, e
18 14 após a indução da colite e posterior infusão de MSC, e dos grupos controles ou
19 doentes não tratados, com o auxílio de pipeta Pasteur. Após contagem total de
20 leucócitos em câmara de Neubauer, foram colocados 10ul de sangue em lâmina e
21 feito o esfregaço. Posteriormente esses esfregaços foram corados com corante
22 Panótico Rápido LB (Laborclin, Pinhais/PR Brasil). Em seguida, as células coradas
23 foram contadas de acordo com suas características nucleares e citoplasmáticas
24 como neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos ou eosinófilos, sendo que seus
25 valores foram demonstrados graficamente em frequência e número total de células.

26

27 3.12 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

28

1 Para quantificação de neutrófilos, foi avaliada a atividade da enzima MPO
2 nos tecidos inflamados e controles (Krawisz, 1984). Segmentos de intestino foram
3 cortados em pequenos pedaços, pesados e imersos em solução tampão contendo
4 fosfato de sódio (0,02M) e EDTA (5,58g/L) para homogeneização. Em seguida, o
5 tecido foi centrifugado a 600 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado.
6 O *pellet* foi ressuspensão por agitação em vórtex em solução tampão contendo
7 fosfato de sódio e EDTA, e foi adicionada solução de NaCl 0,2% gelada para lisar as
8 hemácias. O *pellet* obtido após centrifugação foi ressuspensão em solução tampão
9 contendo fosfato de sódio e o detergente H-TAB 0,5% (Brometo de Hexadecil-
10 Trimetil Amônio, Sigma-Aldrich, EUA). Para finalizar a extração das proteínas, as
11 amostras foram congeladas e descongeladas 3 vezes e centrifugadas a 12000 x g
12 por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático,
13 realizado em placas de 96 poços, contendo 25 µl de amostra, que foi revelado pela
14 adição de TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, BD PharmigenTM, São Diego, USA).
15 A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M, a leitura foi realizada em
16 espectrofotômetro a 450 nm.

17

18 3.13 ENSAIO EOSINÓFILO-PEROXIDASE (EPO)

19

20 Para quantificação de eosinófilos, foi avaliada a atividade da enzima EPO
21 nos tecidos coletados (Strath et al., 1985). Os tecidos foram removidos, pesados e
22 ressuspensos em tampão Hanks sem vermelho de fenol, contendo 10 mM de HEPES
23 (Sigma-Aldrich, EUA) e então homogeneizados. As amostras foram centrifugadas a
24 1950 g por 10 min. e o *pellet* lisado por meio de choque hipotônico. Esta suspensão
25 resultante foi novamente centrifugada a 1950 g por 10 min. e o *pellet* ressuspensão
26 em tampão Hanks contendo 0,5% de HTAB. Foi realizado choque térmico das
27 amostras seguido por centrifugação, sendo o sobrenadante utilizado para as
28 reações. As amostras foram incubadas, em placas de 96 poços, com OPD (o-
29 Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão Tris/HCl
30 0,05 mM e H₂O₂ durante 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi
31 interrompida com H₂SO₄ 4M e a absorbância determinada a 492 nm.

3.14 HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Para quantificação das citocinas pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, BD Pharmigen™, San Diego, USA) , foram coletadas amostras do colón de camundongos que receberam PBS, etanol 50%, TNBS e de animais com TNBS tratados com as MSCs. Para tal, os tecidos foram removidos, pesados e ressuspensos em 700 µl de tampão com inibidor de proteases (Complete, Roche) e então homogeneizados. Os homogenatos foram centrifugados a 1950 x g por 15 min e o sobrenadante utilizado para as reações. Foram utilizadas placas com 96 poços, onde 50µl da amostra foram incubados com os anticorpos de captura e de detecção para IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-1 β de acordo com as recomendações do fabricante (BD Pharmigen™, San Diego, EUA) e IL-17 e IL-23 (R&D™ Systems, Canadá). As reações foram reveladas pela adição de TMB e interrompidas pela adição de H₂SO₄ 2N, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a Lm₁450 nm - Lm₂570nm.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

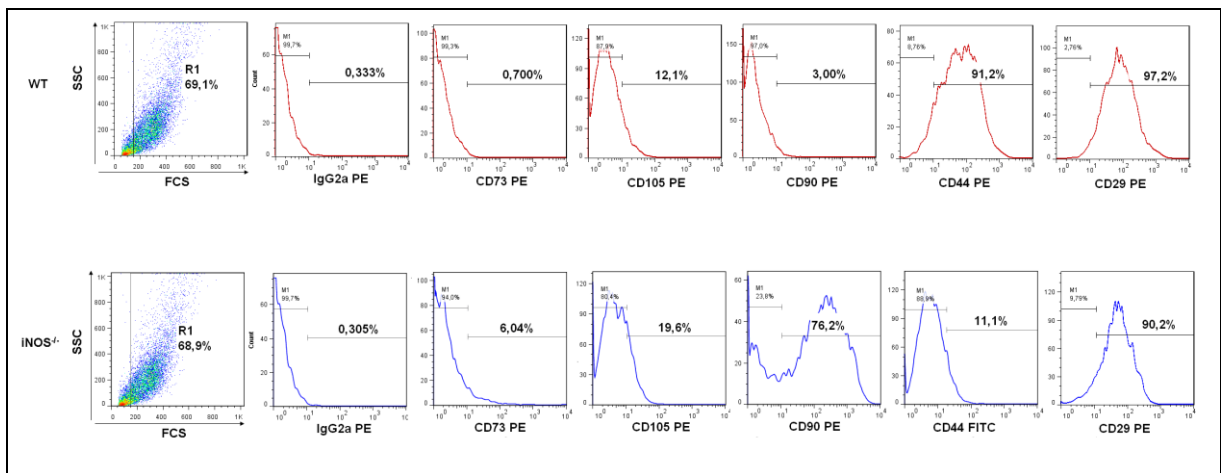
Os resultados encontrados foram tabulados no programa Graphpad Prism 4.0, o qual foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Quando a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea foram utilizados testes t paramétricos não pareados ou ANOVA – *One way* seguido de comparação múltipla de Tukey. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana foram utilizados os testes Mann Whitney (para 2 grupos) ou Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn, para 3 ou mais grupos. Para o gráfico de sobrevida foi utilizado o teste de Kaplan Meyer. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MSC

Inicialmente, com a finalidade de caracterizar as células mesenquimais, foram realizados experimentos quando estas células encontravam-se na 4ª passagem de cultura, para avaliar sua marcação fenotípica e diferenciação. Foi realizada a pesquisa de marcadores que são expressos em células mesenquimais e observou-se que MSC WT apresentaram baixa expressão de CD73, CD105, CD90, simultaneamente à alta expressão de CD44 e CD29. As células MSC iNOS^{-/-} por sua vez, mostraram baixa expressão de CD73, CD105 e CD44, com alta expressão de CD90 e CD29 (FIG. 2).

Figura 2 - Caracterização imunofenotípica de células mesenquimais (MSC) isoladas de medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS^{-/-} saudáveis.



As células mononucleares foram isoladas a partir da medula de ossos como úmero e tibia e cultivadas em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino. Na quarta passagem, as células foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados aos fluorocromos FITC (isotiocianato de fluoresceína) e PE (ficoeritrina) contra vários antígenos de superfície expressos nas MSC (CD73, CD105, CD90, CD44 e CD29). Foi desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC). Os eventos das células viáveis (R1) foram representados por histogramas de fluorescência PE ou FITC e os valores representaram a porcentagem de células positivas para o antígeno analisado.

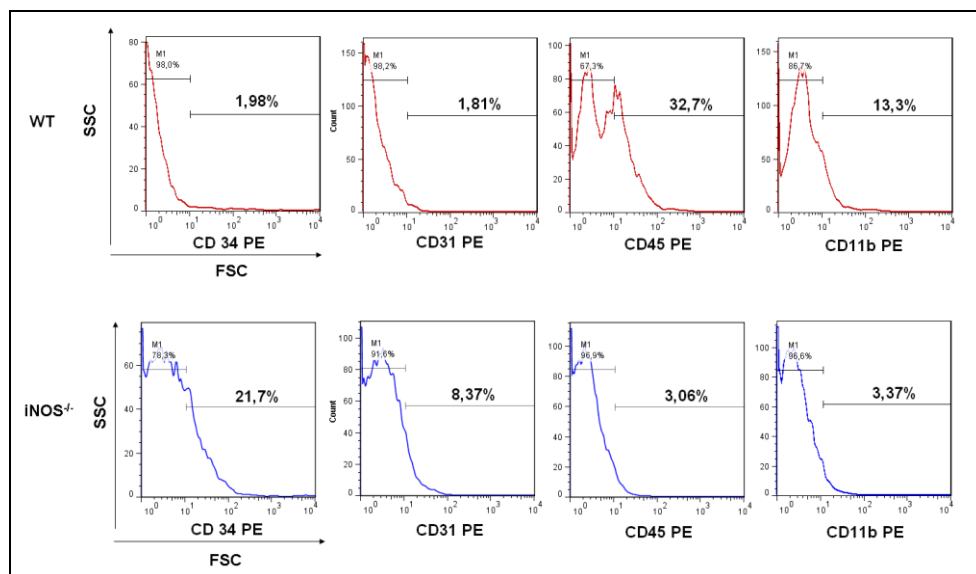
Para sabermos se as células que foram cultivadas possuíam contaminação com outros tipos celulares, procuramos nas culturas de MSC WT e MSC iNOS^{-/-}

Resultados

1 marcadores provenientes de células hematopoéticas, endoteliais, leucócitos,
 2 monócitos e macrófagos. Os resultados mostraram que entre as células WT havia
 3 baixa expressão de CD34 (células hematopoéticas), CD31 (células endoteliais) e
 4 CD11b (monócitos e macrófagos) juntamente à expressão intermediária para CD45
 5 (células leucocitárias). Em contrapartida, a cultura de MSC *iNOS*^{-/-} apresentou
 6 expressão intermediária de CD34 e baixa expressão de CD31, CD45 e CD11b
 7 (FIG.3). Esses achados mostraram que, embora as populações WT e *iNOS*^{-/-} fossem
 8 parcialmente diferentes em relação à marcação fenotípica, as células cultivadas se
 9 tratavam, na maior parte, de MSC, validando nossos experimentos.

10

11 **Figura 3 - Caracterização imunofenotípica de outros tipos celulares nas**
 12 **culturas de células mesenquimais estromais (MSC) isoladas de medula óssea**
 13 **de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 *iNOS*^{-/-} saudáveis.**



14

15 As células mononucleares foram isoladas a partir da medula de ossos como úmero e tibia e
 16 cultivadas em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino. Na quarta passagem, as células
 17 foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados ao fluorocromo PE (ficoeritrina) contra
 18 vários antígenos de superfície expressos em diversos tipos celulares como de células
 19 hematopoéticas, endoteliais, monócitos, macrófagos e leucócitos (CD34, CD31, CD11b e CD45). Foi
 20 desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros
 21 de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os eventos das células viáveis (R1) foram representados
 22 por histogramas de fluorescência PE ou FITC e os valores representaram a porcentagem de células
 23 positivas para o antígeno analisado.

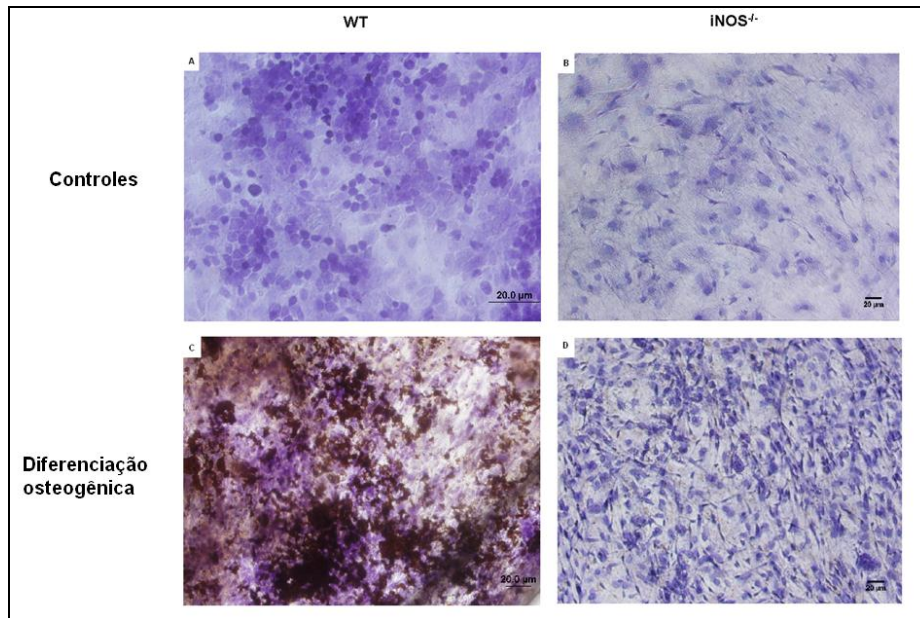
24

25 Com a finalidade de sabermos se as células em questão possuíam
 26 capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, cultivamos as MSC WT e

1 $iNOS^{-/-}$ em meio de indução de diferenciação osteoblástica por 18 dias. Observamos
 2 que as MSC WT se diferenciaram em osteoblastos (FIG.4C), enquanto que as MSC
 3 $iNOS^{-/-}$ não sofreram diferenciação osteoblástica (FIG.4D), conforme observado
 4 pelos depósitos de cálcio em MSC WT e a falta dos mesmos em MSC $iNOS^{-/-}$ com a
 5 coloração de Alizarin Red. As células que não foram cultivadas em meio de
 6 diferenciação osteoblástica não sofreram diferenciação (FIG. 4A e 4B).

7

8 **Figura 4 - Fotomicrografias da diferenciação de células mesenquimais**
 9 **estromais (MSC) em quarta passagem, provenientes de medula óssea de**
 10 **camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 $iNOS^{-/-}$, em osteoblastos.**



11

12 As MSC foram cultivadas por 18 dias em meio indutor de diferenciação osteogênica, seguido por
 13 coloração de Alizarin Red, que evidenciou os depósitos de cálcio na cultura de MSC WT (C) e não em
 14 $iNOS^{-/-}$ (D). As MSC WT e MSC $iNOS^{-/-}$ que não foram cultivadas em meio indutor de diferenciação
 15 osteogênica, mas que passaram pelo processo de coloração não sofreram diferenciação (A e B,
 16 respectivamente).

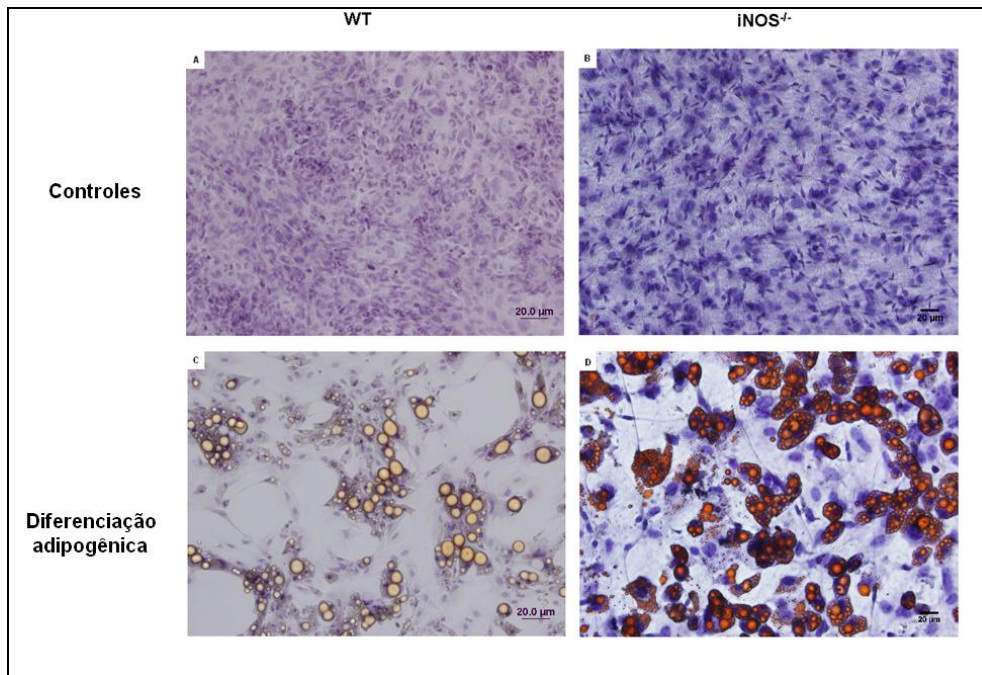
17

18 Ao cultivarmos as MSC WT e MSC $iNOS^{-/-}$ em meio de indução de
 19 diferenciação adipogênica por 21 dias, constatamos que os dois tipos celulares se
 20 diferenciaram em adipócitos, observado pela coloração de Sudan II-Escarlate, a qual
 21 evidenciou a presença de depósitos lipídicos em alaranjado (FIG. 4C e 4D). Células
 22 não cultivadas em meios indutores de diferenciação permaneceram com suas

1 características iniciais (FIG. 4A e 4C). Esses dados sugeriram que as células em
2 questão são fenotipicamente MSC, com potencial de diferenciação, *in vitro*.

3

4 **Figura 5 - Fotomicrografias da diferenciação de células mesenquimais**
5 **estromais (MSC) em quarta passagem, provenientes de medula óssea de**
6 **camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 iNOS^{-/-}, em adipócitos.**



7

8 As MSC foram cultivadas por 21 dias em meio indutor de diferenciação adipogênica, seguido por
9 coloração de Sudan II-Escarlate, que evidenciou os depósitos de gordura na cultura de MSC WT (C)
10 e iNOS^{-/-} (D). As MSC WT e MSC iNOS^{-/-} que não foram cultivadas em meio indutor de diferenciação
11 adipogênica passaram pelo processo de coloração não sofreram diferenciação (A e B,
12 respectivamente).

13

14 4.2 RESULTADOS CLÍNICOS

15

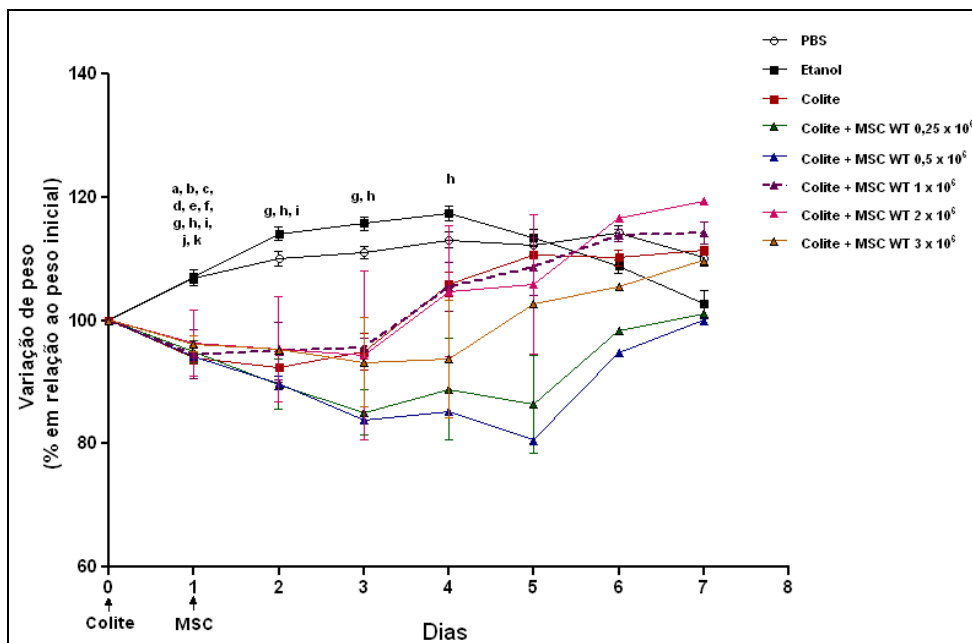
16 Após realizarmos a caracterização imunofenotípica e multipotencial das células
17 mesenquimais tanto provenientes de camundongos C57BL/6 WT quanto de C57BL/6
18 iNOS^{-/-}, induzimos colite em camundongos BALB/c, os quais, após 24h, foram
19 tratados com estas MSC, com o intuito de validar futuros ensaios clínicos nos quais a
20 fonte mais acessível de MSC seria de doadores alogeneicos. Para sabermos qual
21 seria a quantidade ideal a ser infundida em cada camundongo, realizamos testes com

Resultados

1 as concentrações de $0,25 \times 10^6$; $0,5 \times 10^6$; 1×10^6 ; 2×10^6 e 3×10^6 MSC WT por
 2 animal, por via intraperitoneal. Foram analisados os pesos corporais, escore clínico da
 3 doença e mortalidade dos camundongos tratados ou não com MSC, durante os sete
 4 dias iniciais (FIG. 6). Os resultados mostraram que baixas concentrações celulares
 5 ($0,25 \times 10^6$ e $0,5 \times 10^6$) não apresentaram potencial terapêutico em relação às demais
 6 quantidades, inclusive diminuindo a capacidade de ganho de peso dos animais,
 7 principalmente no terceiro, quarto e quinto dias pós-tratamento. No dia 7, mesmo que
 8 de forma discreta, observou-se aumento de peso superior nos animais que receberam
 9 2×10^6 MSC se comparado com o grupo colite (FIG.6).

10

11 **Figura 6 - Avaliação do peso de camundongos BALB/c durante os sete**
 12 **primeiros dias após infusão de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para**
 13 **indução de colite, PBS ou etanol, e posterior tratamento com várias**
 14 **concentrações de células mesenquimais estromais (MSC)**



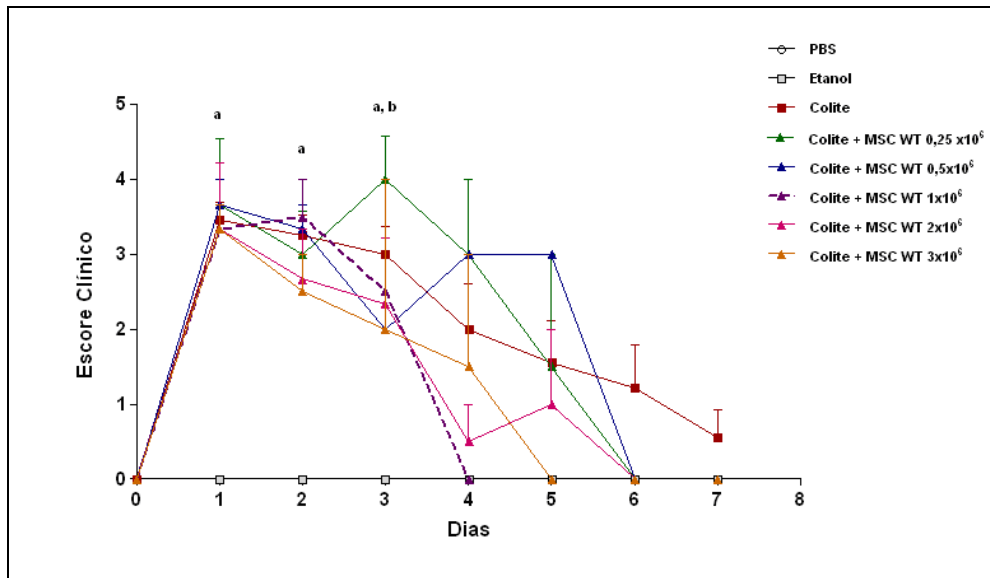
15

16 Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de TNBS, para posterior tratamento
 17 (24h) com MSC provenientes de camundongos C57BL/6 WT, por via intraperitoneal, nas quantidades
 18 de $0,25 \times 10^6$; $0,5 \times 10^6$; 1×10^6 ; 2×10^6 ou 3×10^6 células por animal. Os valores foram
 19 representados como porcentagem em relação ao peso inicial. Diferenças estatisticamente
 20 significativas ($p < 0,05$): a- PBS vs Colite; b- PBS vs Colite + MSC WT $0,25 \times 10^6$; c- PBS vs Colite +
 21 MSC WT $0,5 \times 10^6$; d- PBS vs Colite + MSC WT 1×10^6 ; e- PBS vs Colite + MSC WT 2×10^6 ; f- PBS
 22 vs Colite + MSC WT 3×10^6 ; g- Etanol vs Colite; h- Etanol vs Colite + MSC WT $0,25 \times 10^6$; i- Etanol vs
 23 Colite + MSC WT $0,5 \times 10^6$; j- Etanol vs Colite + MSC WT 1×10^6 ; k- Etanol vs Colite + MSC WT $2 \times$
 24 10^6 ; l- Etanol vs Colite MSC WT 3×10^6 .

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Ainda para avaliar qual seria a melhor dose a ser aplicada nos camundongos receptores do transplante, foram observadas a presença ou ausência de sinais clínicos como, pelo eriçado, hipoatividade, diarreia e sangramento retal durante os sete dias iniciais. Para cada um desses sinais havia uma pontuação que, posteriormente, era plotada em um gráfico de escore clínico (FIG.7). Esse gráfico demonstrou que as baixas concentrações de MSC ($0,25 \times 10^6$ ou $0,5 \times 10^6$) não foram capazes de diminuir os sinais clínicos da doença como ocorreu nos camundongos tratados com as quantidades de 1×10^6 ; 2×10^6 ou 3×10^6 MSC, as quais conseguiram reduzir os sinais clínicos a partir do terceiro dia, mostrando eficácia no tratamento. Em especial, a concentração de 1×10^6 se mostrou mais eficaz, uma vez que no quarto dia os animais que receberam essa quantidade já apresentavam ausência dos sinais clínicos e conseqüentemente melhora da colite. Por outro lado, os camundongos não tratados ainda apresentavam elevado escore clínico da doença no quarto dia e, embora a redução do mesmo tenha ocorrido nos dias subsequentes, os camundongos não apresentaram remissão completa da doença até o sétimo dia avaliado.

- 1 **Figura 7 - Escore clínico de camundongos BALB/c durante os sete primeiros**
 2 **dias após infusão de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de**
 3 **colite, PBS ou etanol, e posterior tratamento com várias concentrações de**
 4 **células mesenquimais estromais (MSC).**



5

6 Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de TNBS e tratados 24h depois
 7 com MSC provenientes de camundongos C57BL/6 WT, por via intraperitoneal, nas quantidades de
 8 $0,25 \times 10^6$; $0,5 \times 10^6$; 1×10^6 ; 2×10^6 ou 3×10^6 células por animal. Cada sinal como diarreia, pelo
 9 ericado, sangramento retal e hipoatividade recebiam uma pontuação, e esses valores foram
 10 transferidos para um gráfico de escore clínico. Diferenças estatisticamente significativas (* $p < 0,05$):
 11 a- PBS vs colite, b- etanol vs colite.

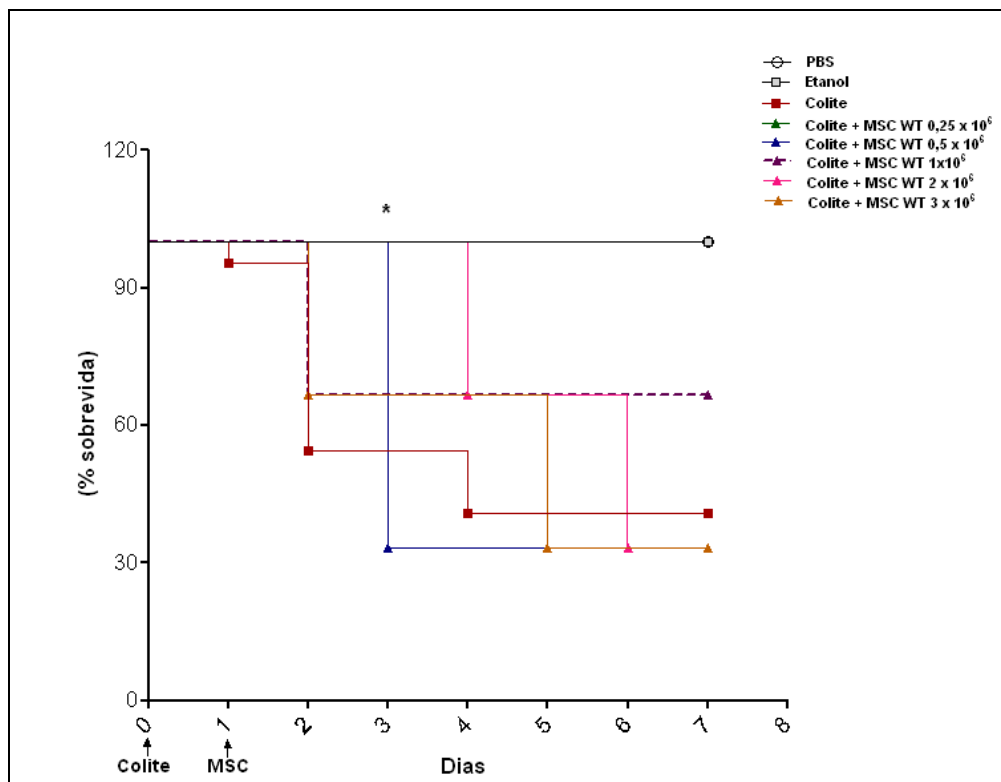
12

13 A capacidade de diminuição da taxa de mortalidade pós-colite foi avaliada por
 14 meio da análise de sobrevivência dos camundongos tratados com as diferentes
 15 concentrações de MSC. Pudemos constatar que os animais que receberam
 16 quantidades baixas de células ($0,25 \times 10^6$ ou $0,5 \times 10^6$) não tiveram sobrevivência
 17 aumentada com o tratamento. De forma semelhante, os camundongos que
 18 receberam maiores quantidades de células (2×10^6 e 3×10^6) também apresentaram
 19 mortalidade alta, pouco diferente daqueles não tratados. Por outro lado, a
 20 quantidade de 1×10^6 mostrou ser a ideal pois, em comparação a todos os outros
 21 grupos que receberam tratamento, foi a mais eficaz na diminuição dos sinais e ainda
 22 na manutenção da sobrevivência dos animais como visto na FIG.8. Além disso, foi
 23 uma quantidade descrita, com êxito, em trabalhos já publicados (González, M. 2009)
 24 e também usada com sucesso em experimentos de transplante xenogênicos de

1 MSC em trabalho anterior de nosso grupo (Alves V.B.F., dissertação de mestrado,
2 2011)

3

4 **Figura 8 - Avaliação de sobrevivência dos animais durante os sete primeiros dias**
5 **após indução da colite e infusão de células mesenquimais estromais (MSC)**
6 **WT.**



7

8 Camundongos foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido
9 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com MSC por via
10 intraperitoneal nas quantidades de $0,25 \times 10^6$; $0,5 \times 10^6$; 1×10^6 ; 2×10^6 ou 3×10^6 células por animal.
11 A sobrevivência dos camundongos doentes e tratados foi avaliada e quantificada durante os 7 primeiros
12 dias após indução da colite e tratamento. * $p < 0,05$ comparando-se os grupos colite e tratados.

13

14 Sendo assim, a concentração de 1×10^6 MSC foi a de escolha para
15 realização dos experimentos posteriores, com o intuito de se avaliar o potencial
16 imunomodulador das MSC alogênicas na colite experimental.

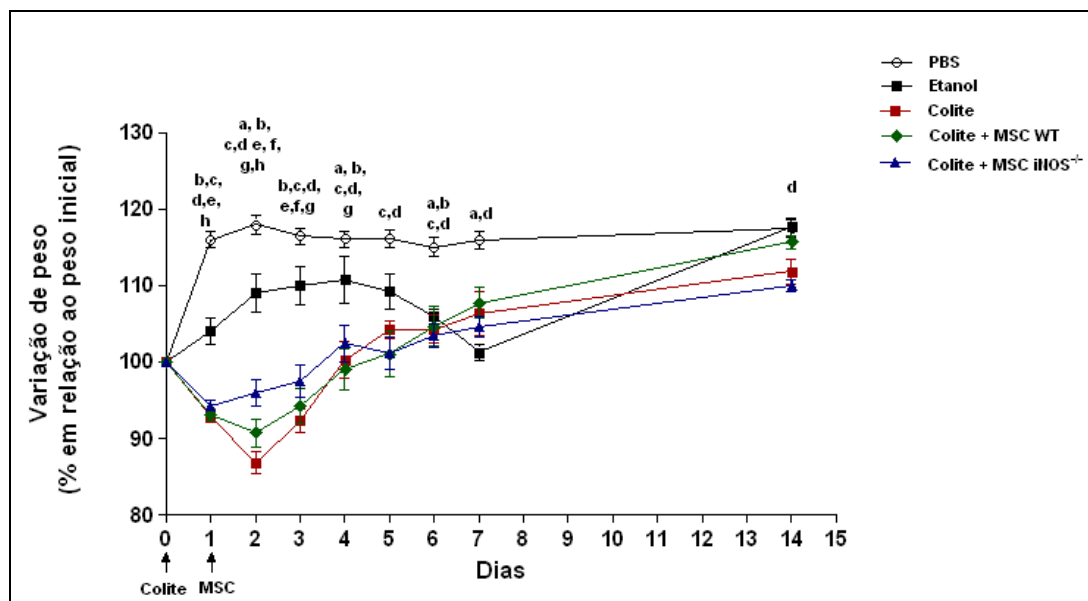
17 Uma vez que a perda de peso é um dos sinais mais evidentes da doença,
18 primeiramente foi analisado este parâmetro nos grupos controles que receberam

Resultados

1 PBS ou etanol 50% (veículo do TNBS) via intrarretal, em outro grupo distinto com
 2 colite induzida por enema de TNBS, chamado de grupo colite, um grupo com colite e
 3 transplantado com 1×10^6 MSC provenientes de camundongos C57BL/6 WT e ainda
 4 em outro com colite e transplantado com 1×10^6 MSC provenientes de camundongos
 5 C57BL/6 $iNOS^{-/-}$. Os animais foram eutanasiados nos dias 3, 7 e 14 após a indução
 6 da colite.

7 Foi observado que os grupos controles PBS e etanol não apresentaram perda
 8 de peso em relação ao grupo colite, o qual teve diminuição significativa de peso em
 9 relação a todos os outros grupos, principalmente no dia 2. O tratamento com os dois
 10 tipos celulares (MSC WT ou MSC $iNOS^{-/-}$) demonstrou eficácia na recuperação dos
 11 camundongos, uma vez que os grupos transplantados apresentaram aumento da
 12 porcentagem de peso em relação ao grupo colite. Ainda, as células MSC $iNOS^{-/-}$
 13 induziram aumento de peso mais acentuado, porém não significativo, em
 14 comparação ao grupo tratado com MSC WT, principalmente nos dias 2 e 3. Porém,
 15 no dia 14 notamos que no grupo que recebeu transplante de MSC WT, houve
 16 aumento de peso mesmo que discreto em relação ao grupo tratado com células
 17 MSC $iNOS^{-/-}$ em relação ao grupo colite (Fig.9).

18 **Figura 9 - Avaliação do peso de camundongos BALB/c durante 3, 7 e 14 dias**
 19 **após indução de colite, enema com PBS ou etanol, e posterior infusão de**
 20 **células mesenquimais estromais (MSC) de C57BL/6 WT ou C57BL/6 $iNOS^{-/-}$.**



21

1 Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico
2 (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células mesenquimais provenientes de
3 camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-} por via intraperitoneal na quantidade de 1x10⁶ células
4 por animal. Os valores estão representados em porcentagem em relação ao peso inicial. Diferenças
5 estatisticamente significativas (* p < 0,05): a- Etanol VS PBS, b- PBS vs Colite, c- PBS vs Colite +
6 MSC WT, d- PBS vs colite + MSC iNOS^{-/-}, e- Etanol vs Colite, f- Etanol vs Colite + MSC iNOS^{-/-}, g-
7 Etanol vs Colite + MSC WT, h- Colite vs Colite + MSC iNOS^{-/-}.

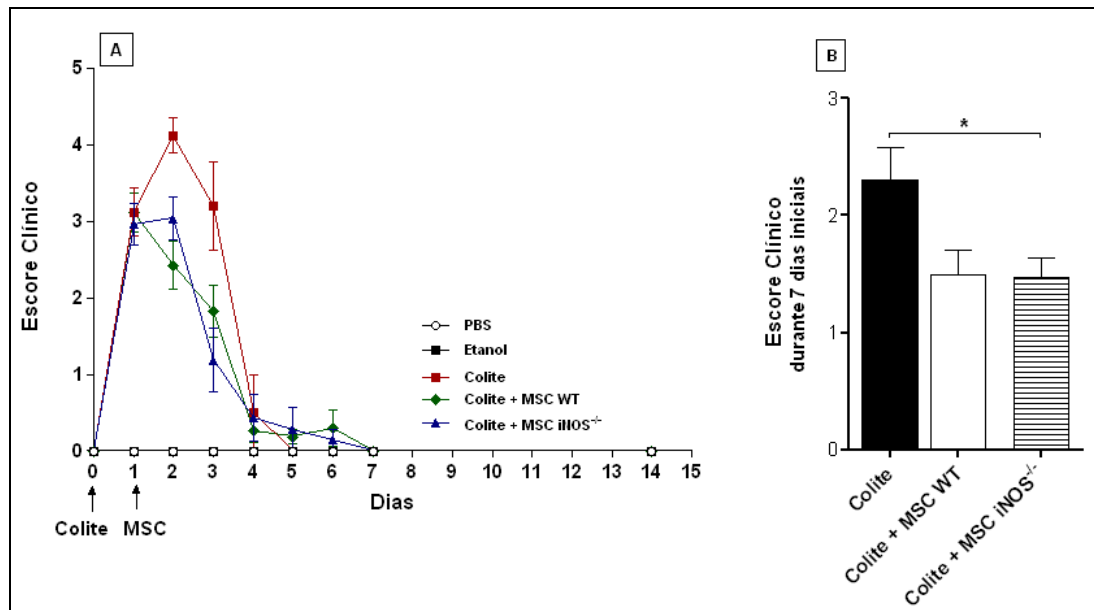
8

9 Para avaliarmos o escore clínico dos camundongos que receberam
10 tratamento com os diferentes tipos celulares, analisamos sinais que são inerentes à
11 colite experimental como diarreia, sangramento retal, hipoatividade, piloereção e
12 perda de peso acima de 5%. Cada sinal apresentado diariamente pelo animal
13 recebeu uma pontuação que foi demonstrada em um gráfico de linhas (FIG.10A). Foi
14 observado que os animais que receberam PBS e o grupo que recebeu etanol
15 intrarretal, não apresentaram qualquer sinal durante os 14 dias de observação. Por
16 sua vez, o grupo colite mostrou escore aumentado já a partir do dia 1, sendo que no
17 dia 2 este aumento foi aparentemente mais visível, retornando à normalidade
18 apenas no dia 5.

19 A partir do 2º dia e no dia 3 ambos os tratamentos celulares mostraram
20 eficácia na diminuição dos sinais provenientes da colite (FIG.10A). Quando
21 agrupamos a pontuação dos 7 dias iniciais em um gráfico de barras, notamos que os
22 animais tratados com MSC WT ou com MSC iNOS^{-/-} foram similarmente eficazes na
23 diminuição dos sinais em relação ao grupo que não recebeu tratamento, sendo esta
24 diferença significativa quando comparamos os grupos colite e aquele que recebeu
25 MSC iNOS^{-/-} (FIG.10B).

26

- 1 **Figura 10 - Avaliação diária do escore clínico após a indução da colite e**
 2 **tratamento com células mesenquimais estromais (MSC) WT ou iNOS^{-/-}.**



3

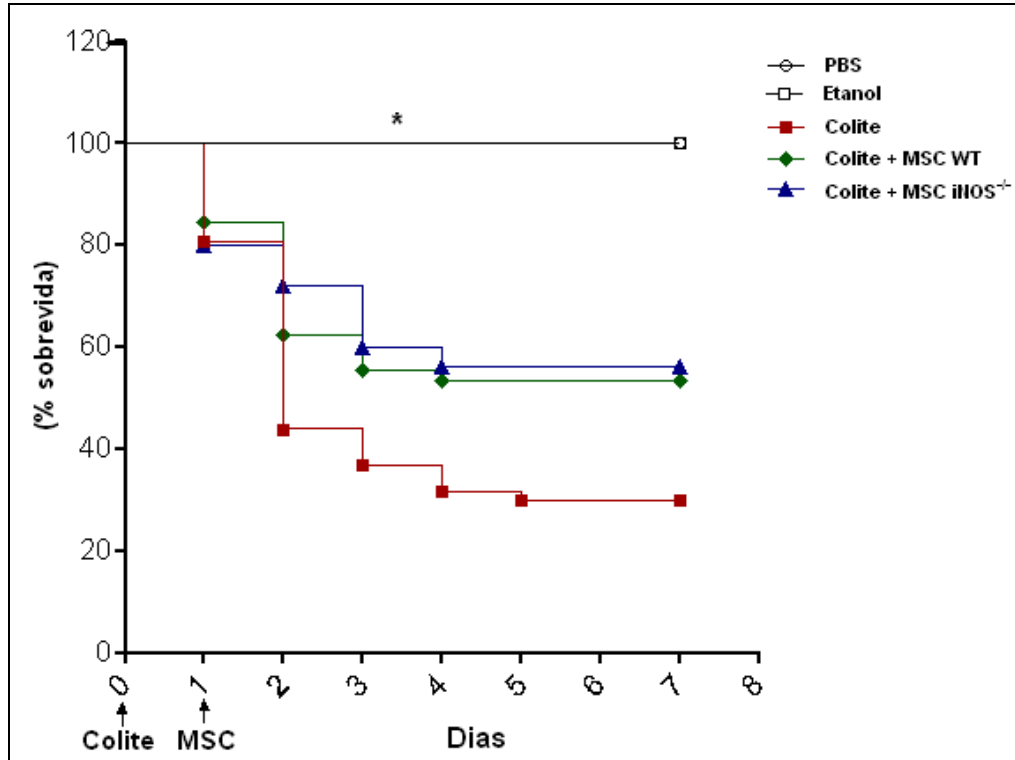
4 Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico
 5 (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células mesenquimais de camundongos
 6 C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-}, por via intraperitoneal, na quantidade de 1×10^6 . Os sinais clínicos
 7 da doença como diarreia, pelo eriçado, sangramento retal e hipoatividade foram observados e
 8 pontuados diariamente para apresentação do escore clínico durante os primeiros 14 dias
 9 experimentais (A) ou agrupados durante os 7 dias iniciais para representação como em (B).
 10 Diferenças significativas (* $p < 0,05$).

11

12 Observou-se também, que dos animais que receberam tratamento com MSC
 13 WT ou MSC iNOS^{-/-} aproximadamente 60% sobreviveram se comparado ao grupo
 14 colite, que manteve cerca de 30% dos animais vivos nos sete dias iniciais. Por outro
 15 lado, aqueles que receberam infusão de PBS ou etanol não morreram, conforme
 16 esperado (FIG.11). Sendo assim, em geral percebemos que ambas as células MSC
 17 WT ou iNOS^{-/-} conseguiram aumentar significativamente a sobrevivência dos
 18 animais, juntamente à diminuição dos sinais clínicos da colite e restabelecimento do
 19 ganho de peso.

20

- 1 **Figura 11 - Avaliação de sobrevivência dos animais durante os sete primeiros dias**
 2 **após indução da colite e infusão de células mesenquimais estromais (MSC) WT**
 3 **ou iNOS^{-/-}.**



4

5 Os camundongos foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido
 6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com MSC provenientes
 7 de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-} por via intraperitoneal na quantidade de 1×10^6 . A
 8 sobrevivência dos camundongos doentes e tratados foi avaliada e quantificada durante os 7 primeiros
 9 dias após indução da colite e tratamento. * $p < 0,05$ comparando-se Colite vs Colite + MSC WT; Colite
 10 vs Colite + MSC iNOS^{-/-}.

11

12 4.3 AVALIAÇÃO SISTÊMICA

13

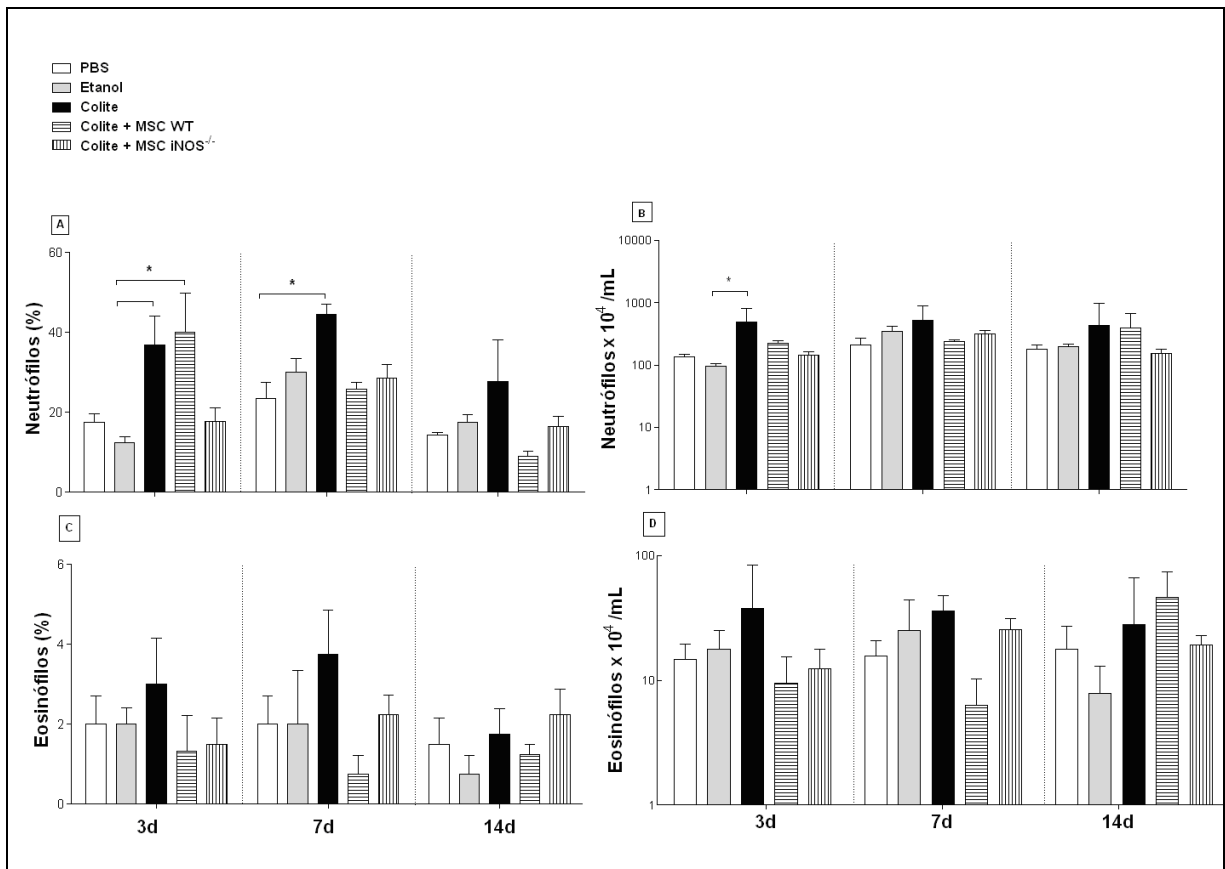
14 A contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico é um parâmetro
 15 importante para indicar alterações sistêmicas na presença de colite, assim como
 16 quadros de imunossupressão que podem ocorrer após tratamento com MSC. Sendo
 17 assim, avaliamos esfregaços sanguíneos dos animais doentes e tratados para
 18 averiguar estas supostas alterações periféricas.

1 Ao analisarmos as células polimorfonucleares constatamos que, em 3 dias, a
2 frequência de neutrófilos estava aumentada no grupo colite e no grupo tratado com
3 MSC WT. É pertinente ressaltar que esse aumento foi significativo se comparado
4 aos animais que receberam etanol intrarretal. Já o grupo tratado com células iNOS^{-/-}
5 mostrou valores próximos da normalidade (FIG.12A). No período de 7 dias, este
6 aumento significativo da porcentagem de neutrófilos do grupo colite foi persistente,
7 especialmente em comparação com os animais que receberam PBS. Nos animais
8 tratados, os valores aproximaram-se da normalidade, sendo que em 14 dias esses
9 resultados foram semelhantes (FIG.12A). Em adição, na contagem total de
10 neutrófilos, observamos que os animais doentes tinham valores significativamente
11 aumentados em 3 dias, se comparado ao grupo etanol, e uma normalização
12 aparente desses valores nos animais tratados. Em 7 dias esses achados se
13 repetiram, de forma aparente; porém em 14 dias não foram observadas diferenças
14 entre os grupos avaliados, com exceção de pequeno aumento no número de
15 neutrófilos circulantes nos camundongos com colite tratados com MSC WT
16 (FIG.12B). Na contagem diferencial de eosinófilos, expressa em número e
17 porcentagem, foi visto que nos períodos de 3 e 7 dias houve pequeno aumento no
18 grupo colite e diminuição no grupo tratado com MSC WT no dia 7. Por fim, em 14
19 dias não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos avaliados
20 (FIG.12C e 12D).

21

22

1 **Figura 12 - Contagem diferencial de células polimorfonucleares no sangue**
 2 **periférico.**



3 Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido
 4 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células
 5 mesenquimais provenientes de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-} na quantidade de
 6 1x10⁶ células por animal. Nos dias 3, 7 e 14 eles foram eutanasiados e o sangue periférico coletado
 7 para confecção de esfregaço posteriormente corado com Panótico. A contagem diferencial de
 8 neutrófilos (A, B) e eosinófilos (C, D) foi expressa em porcentagem (A, C) e número absoluto (B, D). *
 9 p < 0,05.
 10

11

12 Em relação à frequência e número de monócitos houve, aos 3 dias,
 13 diminuição aparente no grupo tratado com MSC WT enquanto, aos 7 dias, foi
 14 observado aumento de monócitos no grupo colite (FIG.13A). No dia 14 foi mostrado
 15 que a quantidade total de monócitos estava significativamente aumentada no grupo
 16 tratado com células MSC WT se comparado com o grupo etanol. Nos demais grupos
 17 esses valores se aproximaram da normalidade. (FIG.13B).

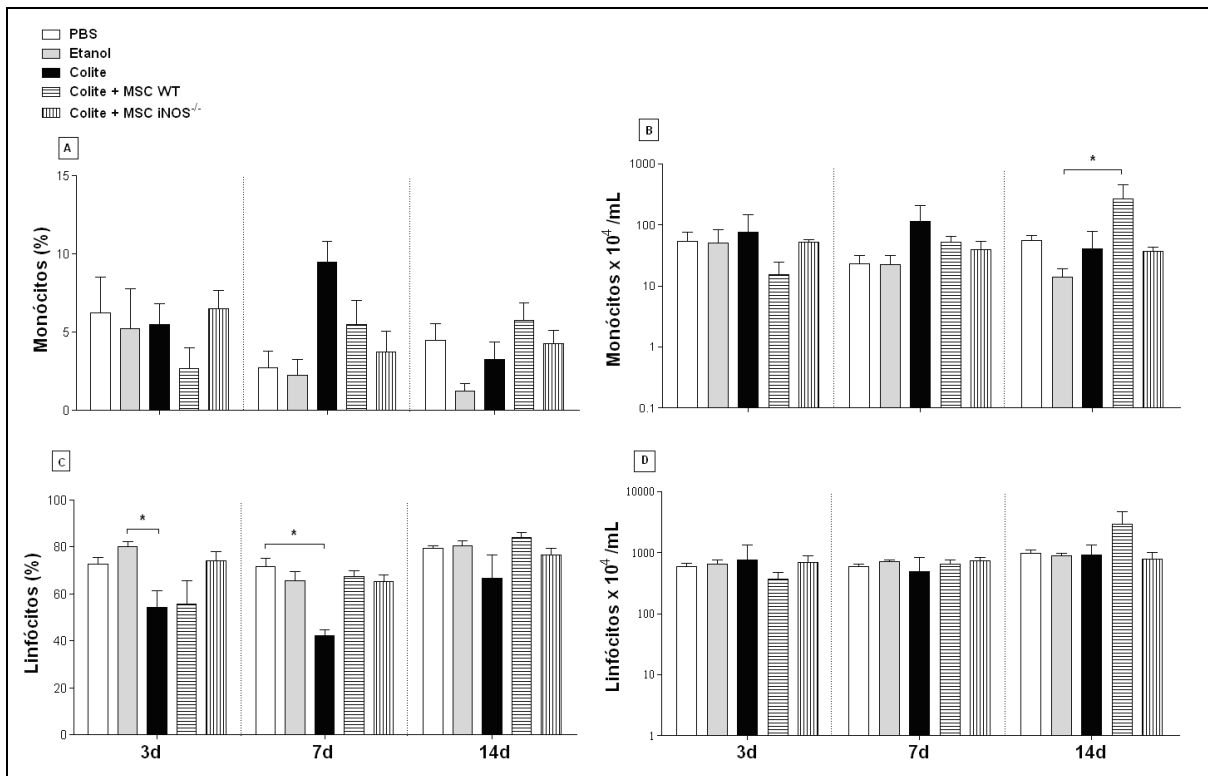
18 A porcentagem de linfócitos circulantes aos 3 dias no grupo colite estava
 19 significativamente reduzida em relação ao grupo etanol, assim como nos

Resultados

1 camundongos tratados com MSC WT, embora esta diferença não tenha sido
 2 estatisticamente significativa (FIG. 13C). Em 7 dias, o grupo colite ainda se manteve
 3 com baixa frequência de linfócitos no sangue periférico, especialmente quando em
 4 comparação com o grupo PBS, enquanto os grupos tratados mantiveram valores
 5 próximos à normalidade (FIG.13C). Em 14 dias não houve diferenças na
 6 porcentagem de linfócitos entre os grupos avaliados, embora tenha sido observado
 7 aumento discreto no número de linfócitos do grupo tratado com MSC WT (FIG.13D).

8

9 **Figura 13 - Contagem diferencial de leucócitos mononucleares no sangue**
 10 **periférico.**



11

12 Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico
 13 (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células mesenquimais provenientes de
 14 camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-} na quantidade de 1x10⁶ células por animal. Nos dias
 15 3, 7 e 14 eles foram eutanasiados e o sangue periférico coletado para confecção de esfregaço
 16 posteriormente corado com Panótico. A contagem diferencial de monócitos (A, B) e linfócitos (C, D)
 17 foi expressa em porcentagem (A, C) e número absoluto (B, D). * p < 0,05.

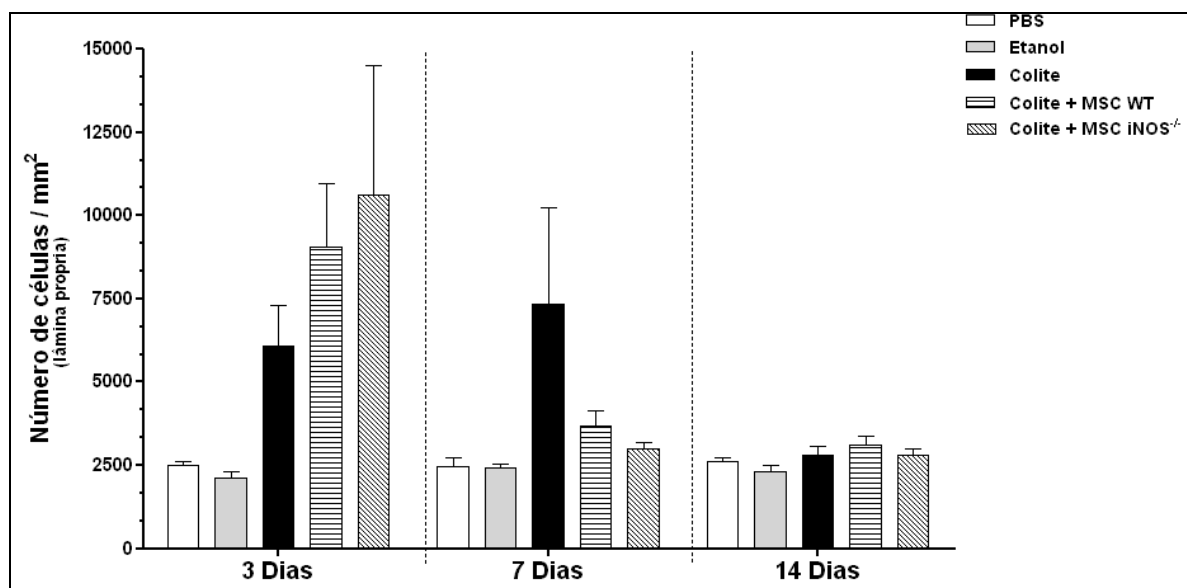
18

19

4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL

Sabendo que a DII cursa com extensa inflamação intestinal, as células do infiltrado inflamatório foram avaliadas após a confecção de lâminas coradas com HE. A contagem de células mononucleadas presentes na lâmina própria incluindo plasmócitos, macrófagos e linfócitos evidenciou que, em 3 dias, todos os grupos que receberam infusão intrarretal de TNBS (colite e tratados) possuíam número maior de células inflamatórias que os grupos PBS e etanol. Em 7 dias, entretanto, nos animais tratados, aconteceu uma normalização aparente da quantidade de células inflamatórias, independente da MSC utilizada, WT ou $iNOS^{-/-}$. Em 14 dias, não havia mais inflamação intestinal exacerbada e todos os grupos apresentavam infiltrado inflamatório normalizado como os grupos PBS e etanol (FIG.14).

Figura 14 - Quantificação da inflamação intestinal na colite e após tratamento com células mesenquimais estromais (MSC).



Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células mesenquimais provenientes de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 $iNOS^{-/-}$. Após 3, 7 e 14 dias os camundongos foram eutanasiados e o cólon coletado

1 para avaliação histológica por morfometria em lâminas coradas por HE. Com a
 2 objetiva de 40x a mucosa intestinal foi fotografada e foi realizada a contagem das
 3 células da lâmina própria.

4 4.5 QUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO DE GRANULÓCITOS NO CÓLON

5

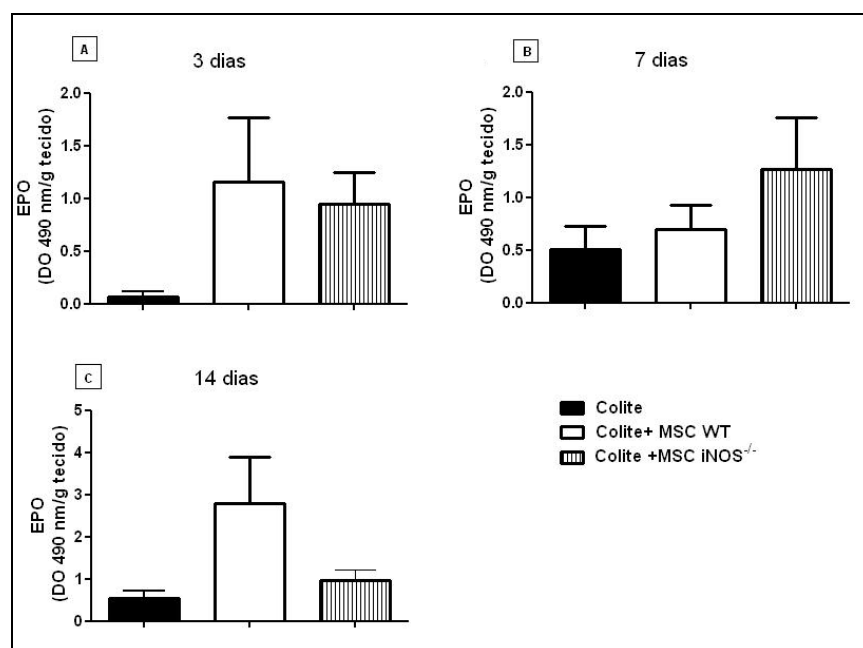
6 4.5.1 Eosinófilos

7

8 A análise quantitativa da enzima eosinófilo-peroxidase (EPO) no cólon dos
 9 animais permitiu verificar que, em 3 dias, o grupo colite teve baixa atividade de
 10 eosinófilos em relação aos animais tratados com MSC WT ou MSC iNOS^{-/-}.
 11 Observamos também que não houve diferença entre ambos os tratamentos nesse
 12 período (FIG.15A). Em 7 dias, foi detectada maior atividade de EPO nos
 13 camundongos tratados com MSC iNOS^{-/-} (FIG.15B) enquanto que ao final de 14
 14 dias, o grupo tratado com células MSC WT apresentou maior quantidade de EPO
 15 (FIG.15C).

16

17 **Figura 15 - Avaliação da atividade da enzima eosinófilo-peroxidase (EPO) no**
 18 **cólon de camundongos com colite ou tratados com células mesenquimais**
 19 **estromais (MSC).**



20

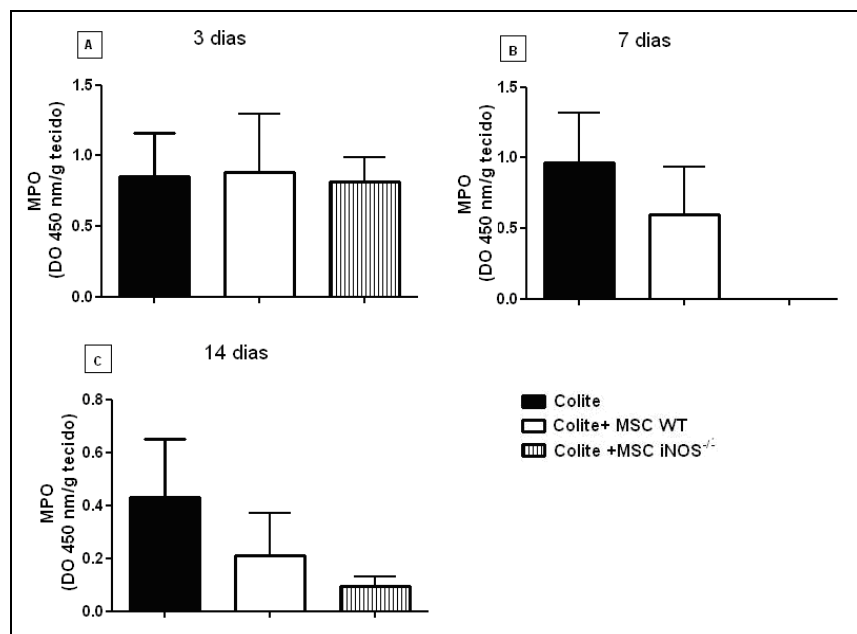
1 Os fragmentos de intestino foram coletados, triturados e processados para ensaio de EPO, com
 2 leitura da densidade óptica dos sobrenadantes a 492 nm. Em (A), avaliação de EPO em 3 dias, (B) 7
 3 dias e em (C) 14 dias.

4 4.5.2 Neutrófilos

5 Ao realizarmos os ensaios de mieloperoxidase (MPO) observamos que,
 6 em 3 dias, praticamente não havia diferença entre os grupos (FIG.16A), sendo que
 7 em 7 dias foi visto que a quantidade de infiltrado inflamatório de neutrófilos estava
 8 aumentada no grupo colite e diminuída no grupo tratado com MSC, em especial com
 9 células iNOS^{-/-} (FIG.16B). Em 14 dias os camundongos com colite continuaram com
 10 MPO elevado concomitantemente à manutenção de níveis baixos nos animais
 11 tratados com células iNOS^{-/-} (FIG.16C). Em resumo, estes achados evidenciaram
 12 diminuição da atividade de neutrófilos nos animais tratados em 7 e 14 dias em
 13 comparação com o grupo colite, sendo o tratamento com células iNOS^{-/-} mais eficaz
 14 nesse contexto.

15

16 **Figura 16 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no cólon**
 17 **de camundongos com colite ou tratados com MSC.**



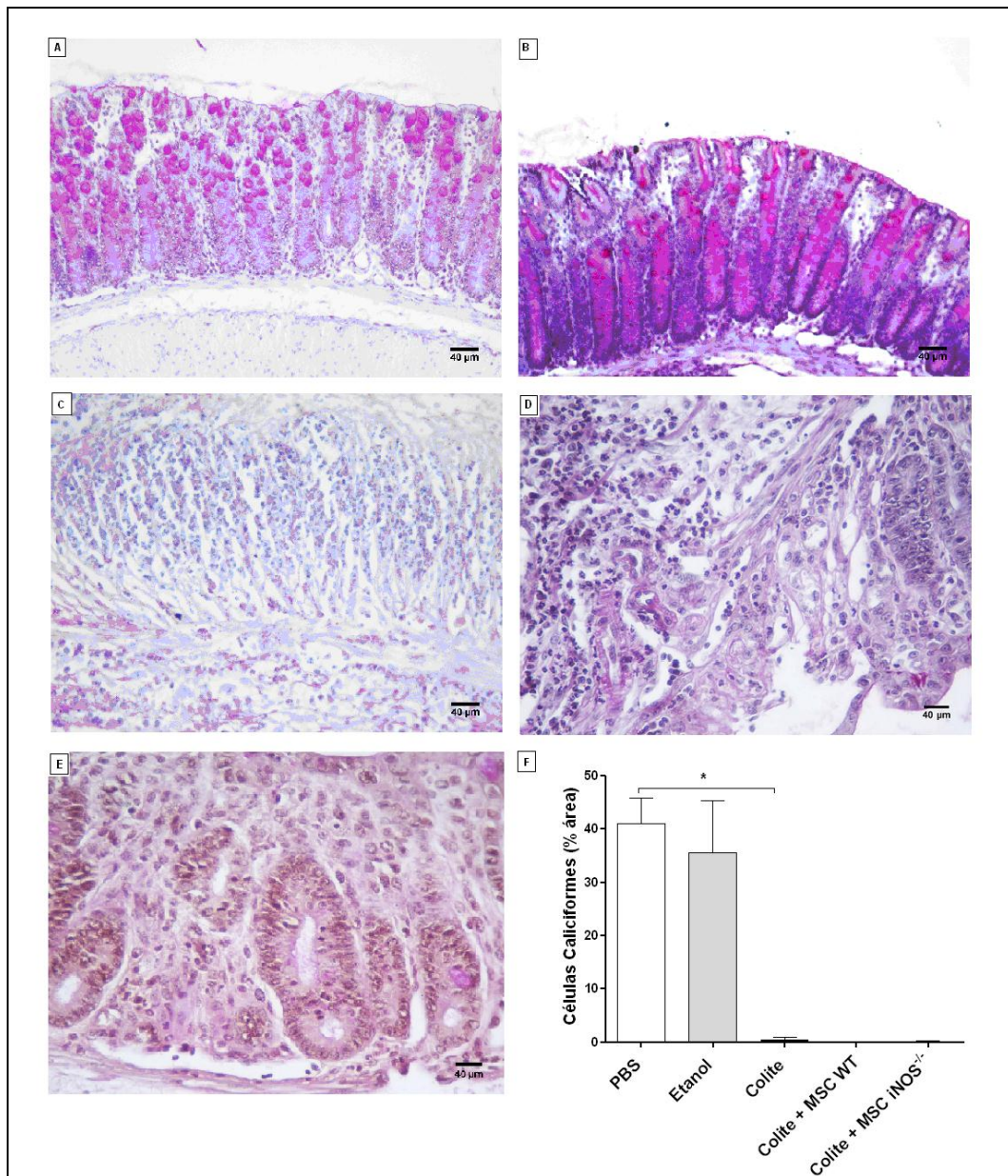
18

19 Os fragmentos de intestino foram coletados, triturados e processados para ensaio de MPO, com
 20 leitura da densidade óptica dos sobrenadantes a 450 nm. Em (A), avaliação de MPO em 3 dias, (B) 7
 21 dias e em (C) 14 dias.

22

1 Em seguida, para observar a arquitetura intestinal e quantidade de células
2 caliciformes produtoras de mucina, que são indicativos de recuperação da
3 integridade intestinal, as lâminas coradas com ácido periódico de Shiff foram
4 fotografadas em objetiva de 40x e os pontos magenta quantificados. Podemos
5 observar que, em 3 dias, os animais que receberam PBS intrarretal mostraram
6 arquitetura intestinal preservada com criptas dispostas de forma reta e paralela e
7 com células caliciformes produtoras de mucina em quantidades normais (FIG.17A).
8 Os camundongos que receberam etanol mostraram que a característica da mucosa
9 intestinal não mudou em comparação com o grupo PBS, mantendo toda a
10 arquitetura preservada, não interferindo na produção de mucina (FIG 17B). Por sua
11 vez, no grupo com a colite, observou-se, no 3º dia perda do epitélio intestinal com
12 total depleção de mucina (FIG.17C). No grupo doente tratado com células MSC WT,
13 verificou-se ainda a arquitetura intestinal destruída contendo células do infiltrado
14 inflamatório, com produção diminuída de mucina (FIG.17D). O grupo tratado com
15 células MSC iNOS^{-/-} também apresentou destruição da camada epitelial intestinal,
16 com baixa quantidade de células caliciformes, bem como da produção de mucina
17 (FIG.17E). Todos esses dados foram indicados graficamente, confirmando as
18 análises histopatológicas (FIG.17F).

- 1 **Figura 17 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais em 3 dias**
 2 **e contagem de pontos de células caliciformes expressos graficamente.**



3

4 Os camundongos foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido
 5 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células
 6 mesenquimais provenientes de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-}. Após 3 dias eles
 7 foram eutanasiados, o colon coletado e as lâminas foram confeccionadas e coradas com PAS. Com
 8 a objetiva de 40x a mucosa intestinal foi fotografada e foi realizada a contagem de pontos magenta
 9 correspondentes às células caliciformes. (A), animais que receberam PBS intrarretal; (B) animais que
 10 receberam etanol 50% intrarretal; (C), animais que receberam injeção intrarretal de TNBS; (D),
 11 animais que receberam injeção intrarretal de TNBS e foram tratados com MSC WT; (E), animais que
 12 receberam injeção intrarretal de TNBS e foram tratados com MSC iNOS^{-/-}; (F), representação gráfica
 13 da quantificação de mucina aos 3 dias. * p < 0,05.

14

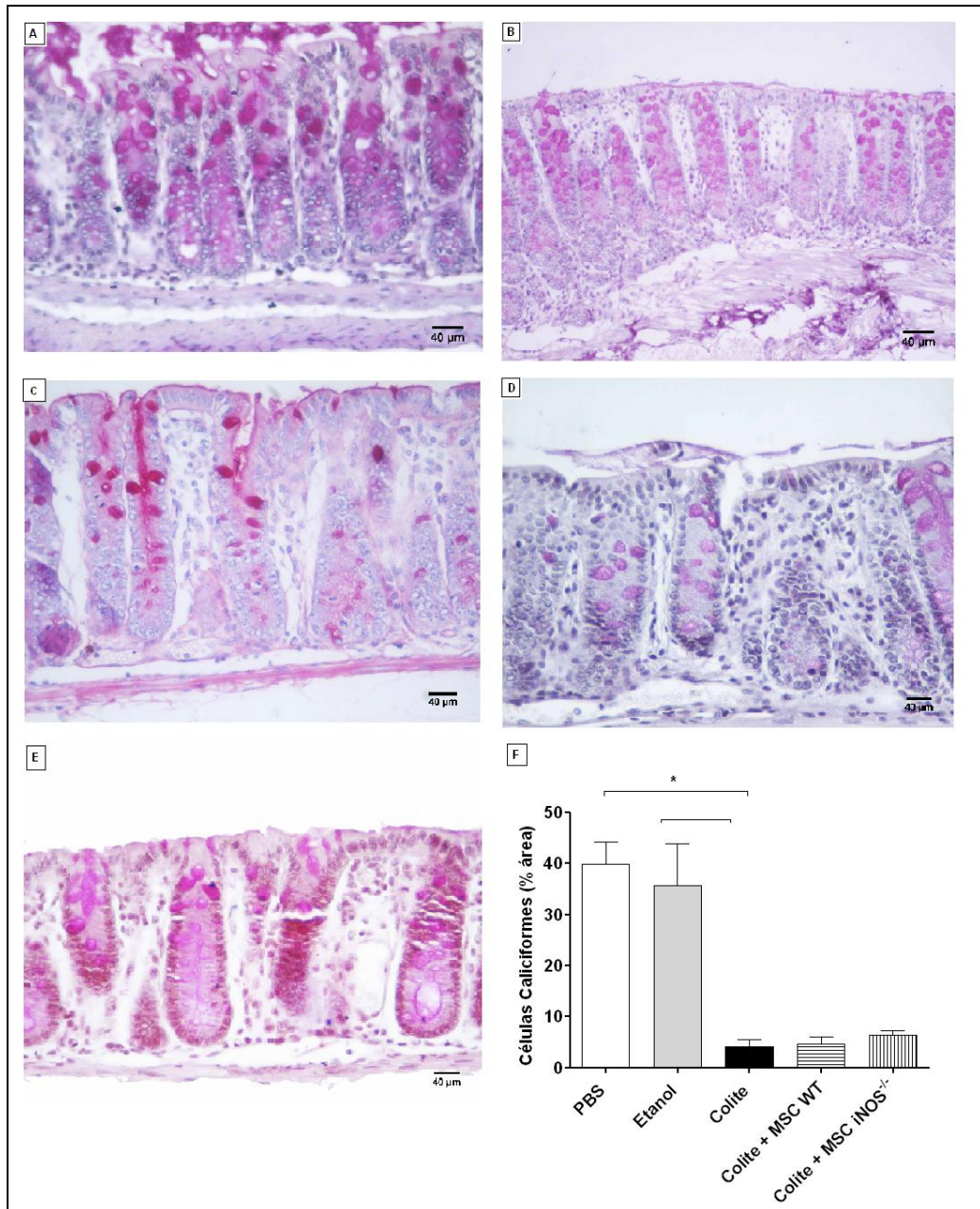
1 Quando observamos os animais do grupo PBS e etanol em 7 dias, vimos
2 que seguiram os mesmos padrões daqueles de 3 dias. Ainda, foi observado um
3 discreto aumento de células caliciformes juntamente com a produção de mucina nos
4 animais doentes e naqueles tratados com ambas as linhagens celulares nesse
5 período. Por fim, em 14 dias, obtivemos os mesmos resultados para os grupos
6 controle de PBS e etanol relatados anteriormente, enquanto que o grupo colite
7 apresentava baixa quantidade de mucina, porém com recuperação inicial da
8 destruição causada pelo TNBS. De forma semelhante, os grupos tratados com MSC
9 tiveram reconstituição similar do epitélio intestinal seguido de produção de mucina,
10 independente de NO (FIG.19).

11

12

13

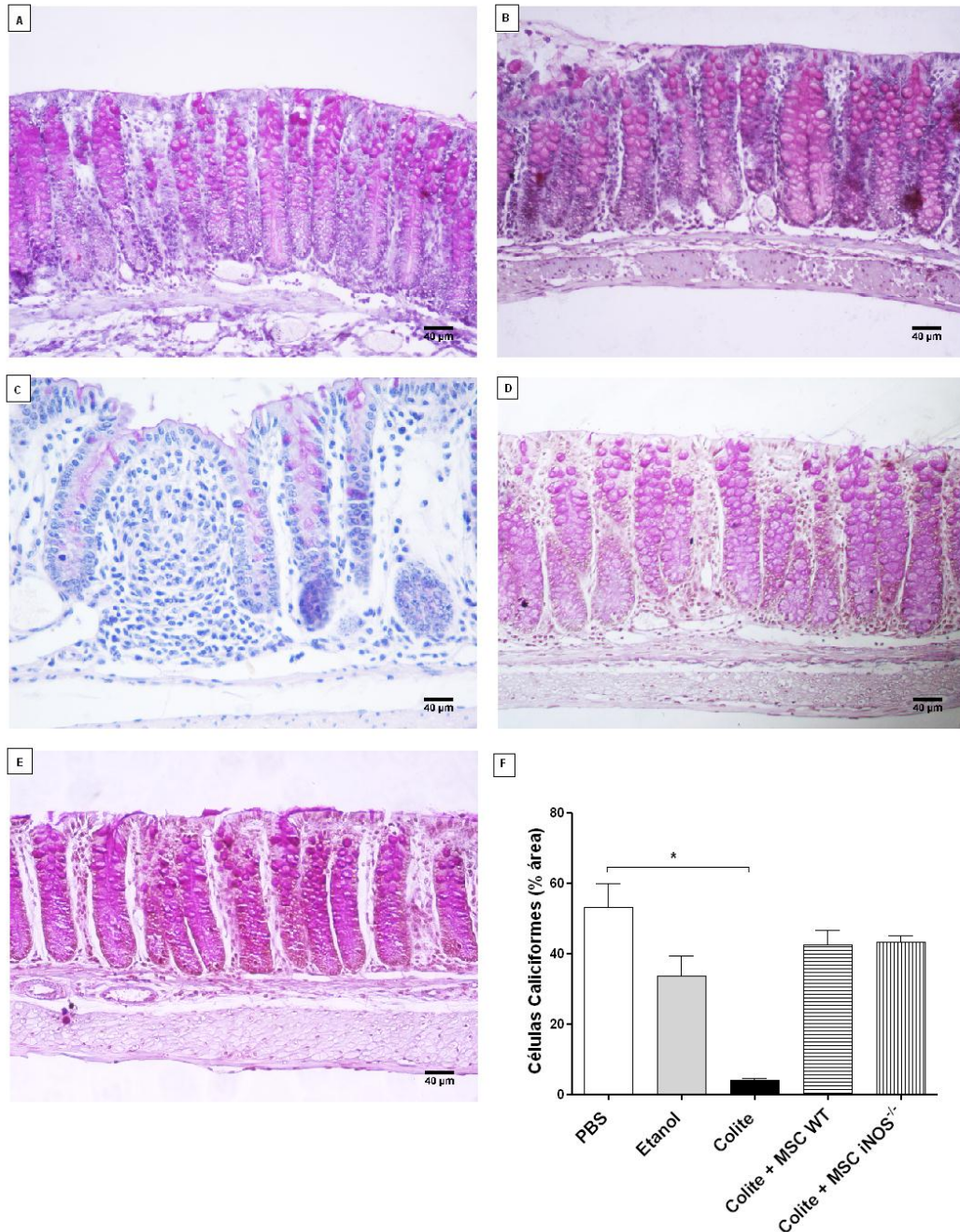
- 1 **Figura 18 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais em 7 dias**
 2 **e contagem de pontos de células caliciformes expressos graficamente.**



3

4 Os camundongos foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido
 5 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células
 6 mesenquimais provenientes de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-}. Após 7 dias eles
 7 foram eutanasiados, o cólon coletado e as lâminas foram confeccionadas e coradas com PAS. Com a
 8 objetiva de 40x a mucosa intestinal foi fotografada e realizada a contagem de pontos magenta
 9 correspondentes às células caliciformes. (A), animais que receberam PBS intrarretal; (B), animais que
 10 receberam etanol 50% intrarretal; (C), animais que receberam injeção intrarretal de TNBS; (D),
 11 animais que receberam injeção intrarretal de TNBS e foram tratados com MSC WT; (E), animais que
 12 receberam injeção intrarretal de TNBS e foram tratados com MSC iNOS^{-/-}; (F), representação gráfica
 13 da quantificação de mucina aos 7 dias. * p < 0,05.

- 1 **Figura 19 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais em 14 dias**
 2 **e contagem de pontos de células caliciformes expressos graficamente.**



3

4 Os camundongos foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido
 5 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e tratados 24h depois com células
 6 mesenquimais provenientes de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-}. Após 14 dias eles
 7 foram eutanasiados, o cólon coletado e as lâminas foram confeccionadas e coradas com PAS. Com a
 8 objetiva de 40x a mucosa intestinal foi fotografada e realizada a contagem de pontos magenta de
 9 células caliciformes. (A), animais que receberam PBS intrarretal; (B) animais que receberam etanol
 10 50% intrarretal; (C), animais que receberam injeção intrarretal de TNBS; (D), animais que receberam
 11 injeção intrarretal de TNBS e foram tratados com MSC WT; (E) animais que receberam injeção
 12 intrarretal de TNBS e foram tratados com MSC iNOS^{-/-}; (F), representação gráfica da quantificação de
 13 mucina aos 14 dias. * $p < 0,05$.

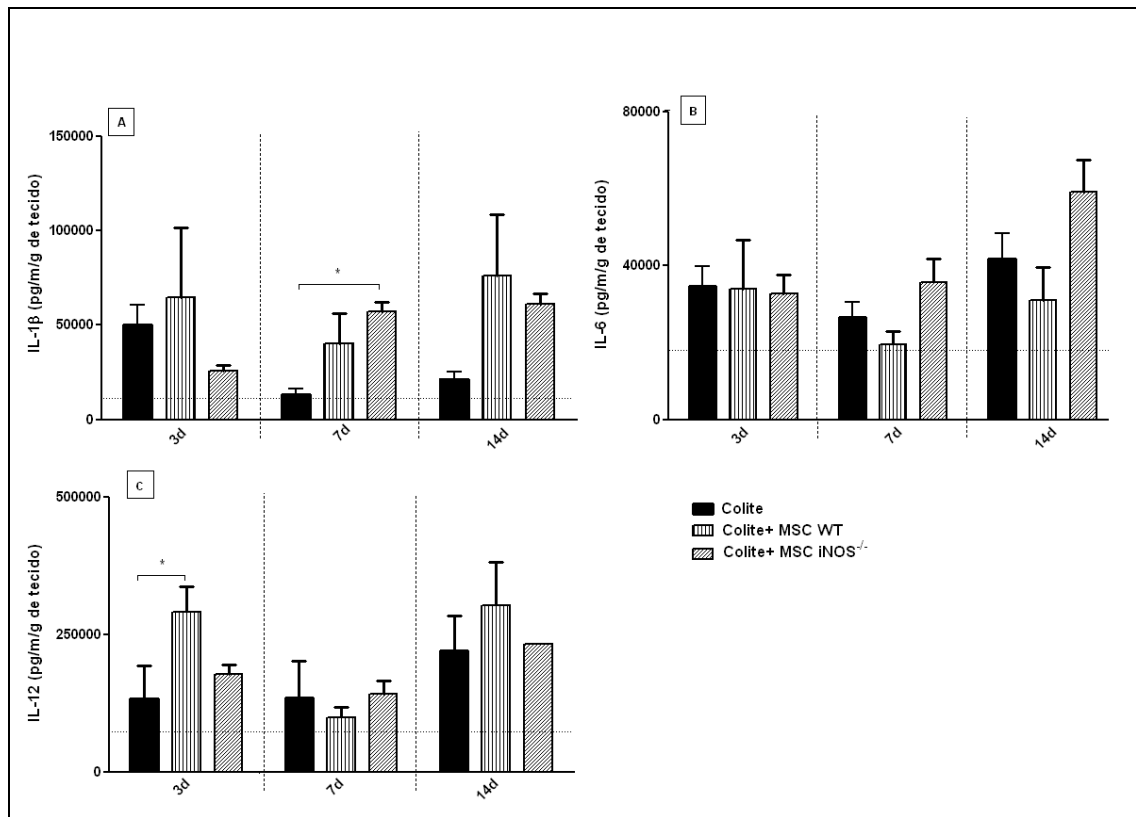
1 4.6 MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL POR MSC: CITOCINAS 2

3 Com intuito de averiguar se houve modulação da resposta inflamatória no
4 intestino dos animais tratados, por meio da indução da produção diferencial de
5 citocinas, fizemos a quantificação das mesmas nos tecidos coletados. Ao avaliarmos
6 citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , em 3 dias, houve diminuição da mesma no
7 grupo tratado com MSC iNOS^{-/-}. Entretanto, em 7 dias, esse grupo apresentou
8 aumento significativo dessa citocina, comparado ao grupo colite, que teve redução
9 da produção de IL-1 β neste período avaliado. Em 14 dias, os mesmos resultados se
10 repetiram no cólon de camundongos com colite e tratados com MSC, sendo que o
11 tratamento com MSC WT não induziu a diminuição de IL-1 β e aparentemente
12 impediu a redução natural da produção dessa citocina após 7 e 14 dias de indução
13 de colite (FIG.20A).

14 Na quantificação de IL-6 não foram observadas diferenças significativas
15 entre os grupos, embora tenha ocorrido aumento aparente no grupo tratado com
16 MSC INOS^{-/-}, em especial no dia 14 pós-colite e tratamento (FIG.20B).

17 Por sua vez, houve aumento significativo de IL-12 no grupo tratado com
18 células MSC WT em comparação com o grupo colite aos 3 dias. Este aumento não
19 foi sustentado aos 7 dias, quando a produção de IL-12 foi reduzida nos
20 camundongos que receberam MSC WT. Entretanto, aos 14 dias houve novamente
21 aumento de IL-12 no cólon dos animais tratados com MSC WT, enquanto nos
22 grupos colite e MSC iNOS^{-/-} esta produção se manteve aparentemente constante em
23 todos os períodos avaliados (FIG.20C).

- 1 **Figura 20 - Avaliação de citocinas pró-inflamatórias no cólon de camundongos**
 2 **com colite e tratados com células mesenquimais estromais (MSC).**



- 4 Fragmentos do intestino de camundongos com colite e/ou tratados com MSC WT ou iNOS^{-/-} foram
 5 removidos e triturados em solução contendo inibidores de protease. As citocinas foram quantificadas
 6 pelo método de ELISA. Os dados foram expressos por pg/ml por grama de tecido. A linha pontilhada
 7 representa a média dos valores controles de PBS (veículo do TNBS)* p < 0,05.

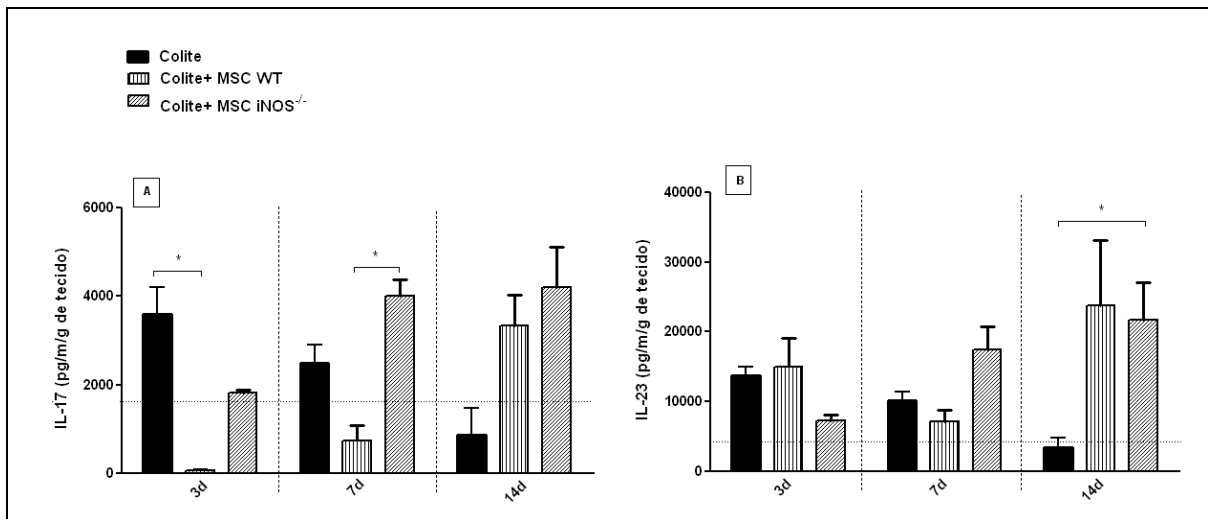
8

- 9 Quando as citocinas do perfil Th17 foram avaliadas, vimos que em 3 dias
 10 houve diminuição significativa de IL-17, que foi parcialmente dependente de iNOS
 11 nos camundongos tratados com MSC WT. Aos 7 dias a diminuição de IL-17 no
 12 grupo tratado com células MSC WT foi mantida, embora se apresentasse
 13 aumentada e significativa no grupo MSC iNOS^{-/-}. Em 14 dias houve aumento
 14 aparente de IL-17 nos animais tratados com MSC WT em relação ao grupo colite,
 15 que apresentou redução da produção dessa citocina no cólon, no decorrer do
 16 período avaliado. Em adição, os animais tratados com MSC iNOS^{-/-} mostraram
 17 elevados níveis de IL-17 no cólon a partir do 7º dia avaliado e também no dia 14
 18 (FIG.21A).

Resultados

1 Ao quantificarmos a citocina IL-23 em 3 dias verificamos diminuição
 2 aparente no grupo tratado com MSC iNOS^{-/-} em relação aos demais grupos.
 3 Todavia, em 7 dias, houve aumento de IL-23 no cólon dos animais tratados com
 4 células MSC iNOS^{-/-} e, aos 14 dias, enquanto os níveis de IL-23 caíram nos
 5 camundongos com colite, mantiveram-se aumentados naqueles tratados com MSC
 6 WT ou iNOS^{-/-} (FIG.21B).

7
 8 **Figura 21 - Avaliação de citocinas do perfil Th17 no cólon de camundongos**
 9 **com colite e tratados com células mesenquimais estromais (MSC).**



10
 11 Fragmentos do intestino de camundongos com colite e/ou tratados com MSC WT ou iNOS^{-/-} foram
 12 removidos e triturados em solução contendo inibidores de protease. As citocinas foram quantificadas
 13 pelo método de ELISA. Os dados foram expressos por pg/ml por grama de tecido. A linha pontilhada
 14 representa a média dos valores controles etanol (veículo do TNBS) com 14 dias. * p < 0,05.

15
 16 Em relação às citocinas do padrão Th2, não houve diferença na produção de
 17 IL-4 entre os grupos avaliados aos 3 dias. Em 7 dias houve, no grupo tratado com
 18 células MSC iNOS^{-/-}, aumento significativo de IL-4 em relação àquele tratado com
 19 MSC WT. Em 14 dias esses resultados se repetiram, mostrando que o tratamento
 20 com células iNOS^{-/-} aumentou a quantidade de IL-4 no cólon dos animais em
 21 questão (FIG.22A). De forma similar, a produção de IL-5 foi mais elevada quando
 22 foram utilizadas MSC que não expressavam iNOS, especialmente aos 7 e 14 dias
 23 avaliados (FIG.22B). Esses resultados sugeriram que embora iNOS auxilie no
 24 controle da resposta inflamatória intestinal, esta via da resposta imune impede o

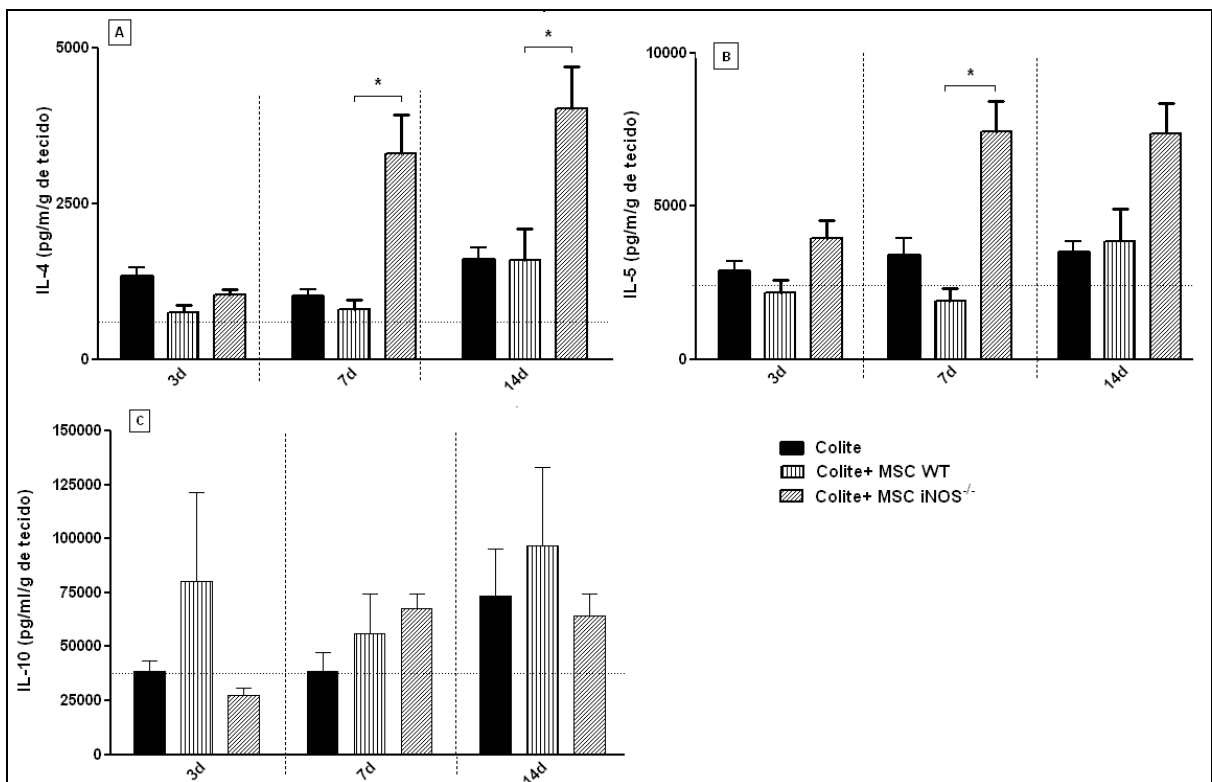
Resultados

1 desvio da resposta para o padrão Th2, o que supostamente modularia a inflamação
2 Th1/Th17 induzida por TNBS.

3 Ao quantificar a citocina reguladora IL-10, observamos aumento inicial no
4 grupo tratado com MSC WT aos 3 dias se comparado com os demais grupos, que só
5 apresentaram elevada produção desta citocina aos dias 7 e 14 (FIG.22C). Esses
6 achados sugeriram que a imunossupressão pós tratamento com MSC foi
7 supostamente mediada por IL-10 e dependente de iNOS na fase inicial da doença,
8 balanceando assim a resposta inflamatória exacerbada no cólon dos camundongos
9 com inflamação intestinal induzida experimentalmente.

10

11 **Figura 22 - Avaliação de citocinas do perfil Th2 e IL-10 no cólon de**
12 **camundongos com colite e tratados com células mesenquimais estromais**
13 **(MSC).**



14

15 Fragmentos do intestino de camundongos com colite e/ou tratados com MSC WT ou iNOS^{-/-} foram
16 removidos e triturados em solução contendo inibidores de protease. As citocinas foram quantificadas
17 pelo método de ELISA. Os dados foram expressos por pg/ml por grama de tecido. A linha pontilhada
18 representa a média dos valores controles etanol (veículo do TNBS) com 14 dias. * p < 0,05.

19

5 DISCUSSÃO

1 Com a finalidade de sabermos se o transplante alogênico de MSC seria
2 eficaz no tratamento da doença inflamatória intestinal, e se a via do iNOS seria
3 importante nessa regulação, avaliamos camundongos com colite e tratados com
4 células mesenquimais de camundongos C57BL/6 WT ou C57BL/6 iNOS^{-/-}.
5 Verificamos sinais clínicos, alterações sistêmicas, com contagem diferencial de
6 neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, infiltrado inflamatório e células
7 calciformes, além da arquitetura intestinal dos animais tratados ou não com as
8 diferentes células. Ainda, avaliamos as concentrações teciduais de citocinas
9 relacionadas aos perfis de resposta Th1, Th2, Th17 e reguladora. Nossos achados
10 mostraram que ambos os tipos celulares, tanto MSC WT quanto MSC iNOS^{-/-}
11 conseguem melhorar os sinais clínicos da colite experimentalmente induzida e ainda
12 regular a inflamação exacerbada causada pela doença, embora por vias diferentes.

13 As MSC têm capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e
14 adipócitos *in vitro* (JIANG et al., 2002; DOMINICI et al., 2006; HORWITZ, 2006) e,
15 uma vez que não expressam MHC de classe II ou moléculas acessórias (CD40,
16 CD80 e CD86), quando transplantadas, desencadeiam pouca ou nenhuma rejeição,
17 reduzindo assim os obstáculos para sua utilização em terapias celulares alogênicas
18 (Le BLANC et al., 2003)

19 Estas células, quando em cultura, apresentam marcadores de superfície
20 característicos. Os achados aqui apresentados sugeriram que nossas culturas eram
21 em grande porcentagem parte constituídas por MSC, porém com pequena
22 “contaminação” de leucócitos na cultura de MSC WT. No entanto, esta pequena
23 quantidade de células não MSC aparentemente não interferiu no processo
24 imunorregulador induzido pela infusão de MSC, como registrado em nossos
25 achados.

26 Neste contexto, existe um consenso geral de que MSC não expressam os
27 marcadores hematopoiéticos CD14, CD34 e CD45 ou moléculas co-estimuladoras
28 como CD80, CD86 e CD40 ao passo que expressam níveis variáveis de CD73,
29 CD90 e CD105, CD44, CD71 e CD271 (DOMINICI et al., 2006). A ampla variedade
30 de expressão destes marcadores é geralmente atribuída a diferenças da espécie,
31 fontes de tecidos e condições específicas de cada cultura experimental (BEN-AMI,

1 BERRIH-AKNIN et al., 2011). Entretanto, a existência de diferenças entre as
2 porcentagens de marcadores nas MSC do presente estudo pode ser devida ao fato
3 dessas células serem populações heterogêneas, independentemente da espécie
4 ou mesmo do tecido de origem (MARIGO et al., 2011), que foram os mesmos para
5 ambos os tipos de MSC cultivados. Neste caso, a presença ou ausência de iNOS foi
6 relacionada à heterogeneidade de expressão de alguns marcadores, como CD44 e
7 CD90. MSC provenientes de camundongos C57BL/6 WT apresentaram CD90 em
8 baixa porcentagem e CD44 em elevada frequência, enquanto que as MSC iNOS^{-/-}
9 tiveram maior marcação para CD90 e baixa expressão de CD44. Estes achados
10 poderiam estar relacionados a uma suposta menor capacidade das MSC iNOS^{-/-} de
11 migrarem para o local da lesão, de forma dependente de CD44. Neste sentido, as
12 MSC WT poderiam ser menos capazes de aderir e migrar, o que explicaria, em
13 parte, algumas diferenças observadas entre ambas as células na modulação da
14 resposta imune intestinal. Qian et al ainda relataram que MSC não expressam CD44
15 fisiologicamente em humanos e camundongos porém pode ser influenciada pela
16 cultura das MSC, mostrando que *in vitro* a CD44 pode ser expressa (QIAN et al.,
17 2012). Por outro lado, a maior expressão de CD90 nas MSC iNOS^{-/-} poderia estar
18 relacionada com uma capacidade aumentada de adesão ao endotélio, em contraste
19 com a menor expressão observada nas MSC WT. Nesse contexto, CD90 é uma
20 molécula abundante na superfície dos timócitos, células T periféricas, mioblastos,
21 células epidérmicas e queratinócitos de camundongos, além de estar envolvida na
22 adesão de leucócitos às células endoteliais e de linfócitos às APCs nas sinapses
23 imunológicas (SAALBACH et al., 2000). Porém, estudos posteriores ainda são
24 necessários para esclarecer se, de fato, esses achados comprometeram a função
25 das MSC em nosso estudo.

26 Em seguida, avaliamos a capacidade das MSC se diferenciarem em
27 osteoblastos e adipócitos. É descrito que MSC se proliferam, aderem em plástico,
28 formam colônias *in vitro* e podem diferenciar-se em osso, cartilagem e gordura
29 (UCCELLI et al., 2008). Nossos dados são concordantes com estes da literatura, os
30 quais validaram nossas culturas de MSC WT, que se diferenciaram em osteoblastos
31 e adipócitos. Contudo, as células MSC iNOS^{-/-} mostraram diferenciação positiva em
32 adipócitos e negativa para osteoblastos, sugerindo que a via iNOS é essencial para

1 a diferenciação osteogênica de MSC. Por outro lado, outros estudos avaliando a
2 produção de tecido ósseo em camundongos iNOS^{-/-} não revelaram quaisquer
3 alterações significativas neste desenvolvimento; entretanto, expressão significativa
4 de iNOS é induzida durante o processo de diferenciação de células progenitoras em
5 osteoblastos (ZARAGOZA et al., 2006). Ainda, estudos de Turner et al demonstraram
6 que a aminoguanidina, um inibidor de NO, conseguiu reduzir a taxa de formação
7 óssea na tíbia de ratas. Essa redução foi completamente revertida pela administração
8 de L-arginina, sugerindo que o NO produzido pela via da L-arginina é responsável
9 pela formação óssea nestes animais (TURNER et al.,1997; BARBAGALLO et al.,
10 2010). Logo, estes dados embasam nossos achados que mostram redução de
11 formação osteoblástica pelas MSC deficientes de iNOS. Em adição, Koyama et al,
12 mostraram que NO produzido em resposta a estimulação de citocinas pode atuar
13 sobre MSC de forma autócrina, acelerando a diferenciação em osteoblastos por
14 regular a deposição de cálcio Ainda, estudos apontam que o NO estimula a
15 produção de PGE2, diretamente envolvida na formação óssea (KOYAMA et al.,
16 2011).

17 No presente estudo, realizamos vários experimentos de dose resposta, para
18 avaliar a melhor quantidade para a terapia de MSC na inflamação intestinal. A
19 quantidade de 1×10^6 MSC/animal foi a mais eficaz, visto que além de aumentar o
20 peso, diminuiu os sinais clínicos da doença e ainda aumentou a sobrevivência dos
21 animais. Logo, esta foi a quantidade de escolha para todos os experimentos
22 envolvidos no projeto. Além disso, Joo et al. mostraram que quantidades baixas de
23 MSC não preveniram a morte de camundongos, e que quantidades intermediárias e
24 elevadas usadas no transplante alogeneico evidenciaram melhora significativa na
25 doença do enxerto-versus-hospedeiro (JOO et al., 2010). Trabalhos de Gonzalez et
26 al., mostraram a mesma concentração aqui utilizada, porém em transplante
27 xenogênico e alogênico no tratamento da DII, com resultados satisfatórios no
28 controle da doença (GONZALEZ et al., 2009 GONZALEZ-REY et al., 2009).

29 As MSC estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento de doenças
30 autoimunes. Atualmente existe uma infinidade de modelos experimentais envolvendo
31 transplante alogeneico no tratamento lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide
32 e na doença do enxerto versus hospedeiro (GvHD) (Le BLANC et al., 2008). Devido

1 à sua baixa toxicidade e o privilégio de serem hipoimunogênicos, transplantes
2 alogênicos com MSC sofrem pouca ou nenhuma rejeição e possuem facilidade de
3 disponibilidade (HARE et al., 2009). No que diz respeito ao lúpus eritematoso
4 sistêmico, quatro pacientes com nefrite melhoraram após uma única dose de infusão
5 alogênica de MSC derivadas de medula óssea (LIANG et al., 2010). Outros estudos
6 têm mostrado que células derivadas de medula óssea contribuem para a
7 cicatrização de feridas gastrointestinais em seres humanos (MATSUMOTO et al.,
8 2005) e em animais (BRITTAN et al., 2005; KOMORI et al., 2005; BAMBA et al.,
9 2006; HAYASHI et al., 2007; KHALIL et al., 2007).

10 Estudos pré-clínicos de utilização de MSC para tratamento de doenças
11 autoimunes têm sido conduzidos em roedores e em outros animais experimentais.
12 Estes incluem a doença de Crohn, colite ulcerativa e diabetes do tipo-1. No contexto
13 da doença inflamatória intestinal, Marjolijn Duijvestein et al. demonstraram que o
14 tratamento com transplante autólogo de MSC de medula óssea melhorou os
15 sintomas da doença e reduziu a proliferação de células mononucleares do sangue
16 periférico na doença de Crohn em dois pacientes, que não precisaram de cirurgia
17 como opção terapêutica (DUIJVESTEIN et al., 2010). Em adição, Gonzáles et al.
18 mostraram que os transplantes xenogênicos e alogênicos de MSC levaram à
19 melhora da inflamação intestinal induzida por TNBS (GONZALEZ et al., 2009).

20 Nossos resultados mostraram ainda que, mesmo as células deficientes da
21 produção de óxido nítrico conseguiram induzir ganho de peso, diminuir o escore
22 clínico da doença e aumentar a sobrevivência dos animais tratados, divergindo
23 parcialmente de trabalhos anteriores que mostraram que a imunossupressão
24 mediada pelas MSC acontece através da ação coordenada de quimiocinas e óxido
25 nítrico (LI et al., 2012; SATO et al., 2006). Além disso, a falta da atividade de iNOS
26 poderia alterar a atividade de MSC de imunossupressora para imunologicamente
27 potente (LI et al., 2012). Também, Sato et al. demonstraram que NO está envolvido
28 na supressão de células T por MSC e que MSC iNOS^{-/-} possuíam reduzida
29 capacidade de suprimir a proliferação de células T *in vitro*. Entretanto, Carine Bouffi
30 et al. relataram que, em um modelo experimental de artrite, MSC iNOS^{-/-} foram
31 capazes de reduzir o inchaço da pata dos camundongos, mesmo que menos
32 eficazes que as MSC WT. Neste caso, a função imunorreguladora de MSC foi

1 dependente principalmente da secreção de PGE₂ e em menor grau, de óxido nítrico
2 (BOUFFI et al., 2010). Ainda, corroborando parcialmente com nossos achados, foi
3 descrito que os efeitos imunossupressores das MSC podem estar relacionados com
4 a secreção de vários outros fatores solúveis, como heme oxigenase (HO)
5 (CHABANNES et al., 2007), TGF-β (BARTHOLOMEW et al., 2001) e IL-6 (NAUTA,
6 et al., 2006), além de PGE₂ (NEMETH et al., 2010).

7 Além de alterações locais, a doença inflamatória intestinal pode causar
8 mudanças sistêmicas relevantes para a evolução da doença e do quadro clínico do
9 paciente acometido. Sendo assim, avaliamos essas alterações e se as MSC WT e
10 MSC iNOS^{-/-} seriam capazes de devolver a homeostasia aos animais doentes.

11 O tratamento com células MSC conseguiu normalizar o número de
12 neutrófilos e eosinófilos no sangue periférico poucos dias após o tratamento. Nesse
13 contexto, segundo M. Lampinen et al., a quantidade de eosinófilos no intestino era
14 mais numerosa em pacientes com UC ativa do que em indivíduos controles que não
15 possuíam a doença (LAMPINEN et al., 2001). Estas células são normalmente
16 presentes na mucosa intestinal, participando da defesa do hospedeiro
17 (ROTHENBERG et al., 2001). No entanto, o número de eosinófilos é bastante
18 aumentado em pacientes com UC (BISCHOFF et al., 1996), e aumento dos níveis de
19 proteínas de grânulos de eosinófilos foi detectado no fluido de perfusão intestinal
20 (CARLSON et al., 1999) e nas fezes (PETERSON et al., 2002) de pacientes com
21 UC. As concentrações elevadas de fatores quimiotáticos de eosinófilos (LAMPINEN
22 et al., 2001) e expressão aumentada de moléculas de adesão (KOIZUMI et al., 1992)
23 no cólon durante a UC ativa indicam que os eosinófilos são ativamente recrutados
24 para a mucosa inflamada, o que poderia justificar seu aumento transitório na
25 circulação, antes do tratamento com MSC, como observado em nossos resultados.

26 A determinação da atividade inflamatória na DII é crucial para a avaliação da
27 atividade da doença e do sucesso da terapia, sendo que a progressão da DII se dá
28 pelo princípio de aumento do infiltrado inflamatório no cólon. Nesse sentido, nossos
29 achados mostraram que o tratamento com ambos os tipos de MSC propiciou
30 aumento de eosinófilos no local da lesão produzindo a enzima eosinófilo peroxidase
31 em 3 e 7 dias, enquanto que em um período mais tardio (14 dias), o acúmulo dessas

1 células foi dependente de NO. Corroborando com nossos resultados, outros autores
2 já destacaram a melhora da DII a partir de infecção por helmintos, pois esse tipo de
3 tratamento desvia o padrão de resposta Th1 ou Th17, para um padrão Th2,
4 diminuindo os sinais da DII (SUMMERS et al., 2003; 2005). Sendo assim, sugerimos
5 que o acúmulo de eosinófilos no cólon dos camundongos tratados pode ter sido
6 benéfico para o controle da resposta inflamatória exacerbada induzida por TNBS,
7 que, em geral, é mediada por IFN- γ e IL-17.

8 Em adição aos eosinófilos, observamos também modulação do acúmulo de
9 neutrófilos no sangue periférico e no intestino dos camundongos com colite, após
10 tratamento com MSC. Esta terapia foi capaz induzir a diminuição inicial de neutrófilos
11 circulantes, que pode ter contribuído para a menor produção tardia de MPO no cólon
12 nos camundongos tratados, em especial quando o tratamento foi realizado na
13 ausência de iNOS. Em concordância com nossos resultados, sabe-se que em
14 pacientes com DII, o acúmulo e infiltração de neutrófilos na mucosa do intestino é
15 uma característica proeminente do processo inflamatório local (FOELL et al., 2003).
16 Os neutrófilos infiltrantes contribuem para a gênese da lesão do tecido e as
17 manifestações clínicas da doença (ENDEMANN et al., 1997). Os estudos em
18 animais demonstraram também a importância dos neutrófilos na indução da lesão
19 tecidual. No modelo de colite aguda e reativada induzida por TNBS em
20 camundongos, a inibição da ativação de neutrófilos, de sua capacidade de adesão
21 ao endotélio vascular ou depleção dessas células da circulação foram benéficas
22 (ELLIOTT et al., 1998). Por outro lado, a produção de grandes quantidades de NO
23 melhora o fluxo sanguíneo e aumenta o recrutamento de leucócitos; contribuindo,
24 assim, para a inflamação. Em adição, a regulação positiva de iNOS se correlaciona
25 com a inflamação prolongada do cólon, que pode exacerbar o quadro clínico-
26 patológico da UC por citotoxicidade direta, ativação de neutrófilos e vasodilatação
27 (KOLIOS et al., 1998). Com base nestas observações e no potencial
28 imunossupressor das MSC, nossos achados que mostraram reduzida atividade de
29 neutrófilos no intestino de camundongos tratados com MSC iNOS^{-/-} sugeriram que
30 este fato poderia estar relacionado à ausência de NO, com acúmulo e/ou ativação
31 reduzidos desse tipo celular pós-tratamento.

1 A frequência de linfócitos se mostrou diminuída nos animais doentes em 3 e
2 7 dias e de monócitos aumentada em 7 dias. Em contrapartida, os animais tratados
3 com MSC iNOS^{-/-} sinalizaram normalização da quantidade de linfócitos na circulação
4 em todos os períodos analisados, porém o tratamento com MSC WT conseguiu essa
5 normalização a partir do 7d. Esses dados sugeriram que o tratamento conseguiu
6 reduzir a inflamação gerada pela DII, pois conseguiu normalizar esses parâmetros.
7 Nossos achados corroboram com Spaggiari et al que sugeriram que MSC ao
8 produzirem PGE₂ inibem fortemente a geração de monócitos e células dendríticas
9 (SPAGGIARI et al., 2009). Nesse contexto Nahor et al mostraram que células CD14⁺
10 (monócitos) exibiram um perfil tolerogênico em co-cultura com MSC humanas, e
11 clara diminuição de moléculas co-estimuladoras, como CD80 e CD86 e ainda foram
12 capazes de inibir a proliferação de linfócitos corroborando com nossos achados que
13 mostram diminuição de leucócitos após tratamento, principalmente em 7 dias (HOF-
14 NAHOR et al., 2012).

15 Em adição, na quantificação de células inflamatórias na lâmina própria do
16 cólon dos animais doentes e tratados com ambos os tipos de MSC, verificamos que
17 houve redução do infiltrado após tratamento, em especial aos 7 dias, Esses dados
18 sugeriram diminuição da resposta inflamatória local após o transplante celular.
19 Estudos corroboram com os nossos achados, mostrando que a doença inflamatória
20 intestinal está relacionada com o infiltrado de leucócitos ativados no tecido intestinal
21 e subsequente dano intestinal da mucosa induzido por espécies reativas de
22 oxigênio, e como resultado, lesão da mucosa (PODOLSKY, 2002). Nesse contexto,
23 Tanaka et al. mostraram que houve uma diminuição da expressão de vários
24 mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL- β e COX-2 e ainda, diminuição do
25 infiltrado inflamatório no cólon de camundongos tratados com MSC enfatizando o
26 papel anti-inflamatório do transplante de MSC (TANAKA et al., 2008).

27 Nossos resultados também mostraram que o tratamento com ambos os tipos
28 celulares conseguiu restituir a arquitetura intestinal a partir do 7º dia, com aumento
29 da quantidade de células caliciformes e produção de mucina principalmente em 14
30 dias. As mucinas são proteínas glicosiladas que formam uma barreira física viscosa
31 que impede o contato entre microorganismos e as células do trato gastrointestinal e
32 também serve como matriz para exposição de substâncias antimicrobianas

1 produzidas por células epiteliais (SHENG et al., 2012). Nesse contexto, o aumento
2 da quantidade de células caliciformes nos camundongos tratados com MSC pode ter
3 sido importante para a reconstrução da barreira física e reconstituição das células
4 caliciformes, independentemente de NO. Godói et al mostraram que houve
5 cicatrização da mucosa e restabelecimento da quantificação de células caliciformes
6 em 7 e 14 dias nos camundongos que receberam tratamento imunossupressor
7 seguido ou não de transplante de medula óssea (GODOI et al., 2012). Em adição,
8 vários trabalhos já demonstraram que transplante com células MSC acelerou
9 significativamente o reparo tecidual intestinal, aumentando a atividade de
10 fibroblastos e deposição de colágeno, melhorando os sinais clínicos e
11 histopatológicos da doença (GONZALEZ, GONZALEZ-REY et al., 2009; ADAS,
12 ARIKAN et al., 2011). Ainda, outro estudo elucidou que as fístulas intestinais
13 causadas pela doença deram lugar ao tecido regenerativo após transplante autólogo
14 de MSC derivadas de medula óssea humana (CICCOCIOPPO et al., 2012)

15 Outra característica intrigante de MSC é a sua aparente capacidade de
16 migrar para o local da lesão quando infundidas sistemicamente. Nos últimos anos,
17 tem sido proposto que MSC podem servir como um poderoso "sistema natural para
18 a reparação de tecidos," e podem ser agentes terapêuticos eficazes em uma
19 variedade de modelos experimentais de lesões (HE et al.,2012). Logo, embora não
20 tenhamos mostrado a migração ou destino das células infundidas, *in vivo*, é possível
21 que as mesmas tenham se localizado no intestino inflamado, liberando fatores que
22 podem ter sido essenciais para o reparo tecidual, assim como o contato direto das
23 MSC com as células locais. Quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento
24 liberados após lesão fornecem informações sobre a suposta migração das MSC
25 infundidas sistemicamente para o local da lesão (KANG et al., 2012).

26 Finalmente, para entender como as MSC poderiam de fato modular a
27 inflamação intestinal e qual o papel do óxido nítrico nesta resposta, foram
28 quantificadas citocinas de padrão inflamatório, Th1, Th2, Th17 e regulador no
29 homogenato de amostras de cólon. Os resultados mostraram que, de forma geral, o
30 tratamento com MSC WT induziu redução da resposta dependente de IL-17, com
31 suposto aumento inicial Th1 (IL-12), ao mesmo tempo em que gerou alta produção
32 de IL-10 no cólon inflamado pós-tratamento. Porém, estas respostas foram

1 provavelmente dependentes da produção de NO pelas MSC infundidas, uma vez
2 que na ausência de iNOS as MSC não foram aparentemente capazes de desviar a
3 resposta intestinal para um padrão regulador inicial mediado por IL-10. Por outro
4 lado, mesmo na incapacidade de produzir NO, de inibir com eficiência a resposta
5 Th17 e de induzir citocinas imunossupressoras, as MSC iNOS^{-/-} inibiram a
6 inflamação intestinal modulando a resposta local para um padrão Th2 de resposta
7 imunológica.

8 Em concordância com nossos resultados, Niedbala et al, mostraram que NO
9 inibe a proliferação de Th17 em humanos e murinos, sendo assim um regulador
10 negativo de células Th17, capaz de prevenir o desenvolvimento de doenças
11 autoimunes (NIEDBALA et al., 2011). Logo, com base nesse achado sugerimos que
12 por esse motivo o tratamento com MSC iNOS^{-/-} não conseguiu reduzir a quantidade
13 de citocinas IL-17 e IL-23 no cólon dos animais, com a mesma eficácia que o
14 tratamento com MSC WT.

15 Vários estudos têm mostrado recentemente que pacientes com DII tem uma
16 infiltração maciça de células Th17 (ROUND et al., 2009), encontradas principalmente
17 na mucosa do TGI, especialmente no intestino delgado. Este *homing* das células
18 Th17 poderia ser indiretamente afetado pela flora intestinal no intestino grosso,
19 direcionando a migração destas células para o intestino (SARRA et al., 2010).
20 Embora alguns estudos tenham sugerido que estas células tenham um papel
21 regulador sobre a inflamação no ambiente intestinal, especialmente interferindo a
22 imunidade mediada por Th1, e conseqüentemente por IFN- γ (YANG et al., 2008),
23 grande parte dos trabalhos científicos tem demonstrado um papel pró-inflamatório
24 desta população, relacionando seu aumento, assim como de IL-17, com o
25 desenvolvimento e pior prognóstico na DII (FUJINO et al., 2003; SARRA et al., 2010).
26 Neste contexto, a localização das MSC neste ambiente, juntamente com a sua
27 plasticidade e efeitos reguladores sobre outras células do sistema imune, sugerem a
28 sua importância na mediação da inflamação gastrointestinal. Um relato recente
29 mostrou que os níveis de IL-17 e a quantidade de células Th17 foram maiores em
30 pacientes com UC e CD em comparação com indivíduos normais e em pacientes
31 com colite isquêmica, e essas células Th17 foram encontradas em abundância na
32 mucosa e submucosa da UC e CD, respectivamente (ROUND et al., 2009). Esses

1 achados corroboram com nossos resultados que mostram que em 3d o tratamento
2 conseguiu reduzir os níveis de IL-17 reduzindo a inflamação nesse local.

3 A análise molecular do perfil de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺
4 das mucosas levou à descoberta de que, em DC, linfócitos TCD4⁺ produzem
5 predominantemente IFN- γ , citocina assinatura de padrão Th1 (FUSS et al., 1996).
6 Consistentemente, IL-12, também é produzida em excesso por macrófagos no tecido
7 inflamado de pacientes com DC (MONTELEONE et al., 1997). Células T CD4⁺ das
8 mucosas de pacientes com DC superexpressam a cadeia IL-12R β 2 necessária para
9 a sinalização de IL-12, e também Stat4 e T-bet, dois fatores de transcrição
10 necessários para a condução e sustentação da resposta Th1, desempenhado um
11 papel chave na iniciação e progressão da colite (PARRELLO et al., 2000).

12 Um mediador anti-inflamatório importante na imunossupressão e função de
13 células T reguladoras (Tregs) é a IL-10. Esta interleucina é secretada por muitas
14 células, incluindo as células T helper (Th), monócitos/macrófagos, células
15 dendríticas, células B e queratinócitos (BIONDO et al., 2003). IL-10 suprime a
16 inflamação por vários mecanismos imunológicos, incluindo a redução da expressão
17 de HLA classe II, da secreção de IL-2 pelas células T e diminuição de outras
18 citocinas como TNF- α e IL-8, pela desativação de monócitos e macrófagos
19 (HERFARTH et al., 2002). A deficiência do gene da IL-10 em camundongos propicia
20 o desenvolvimento de inflamação transmural do intestino, lembrando a doença de
21 Crohn. Sabe-se que camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem enterocolite
22 crônica e, ainda, que a imunorregulação mediada por MSC poder ser realizada por
23 vários mecanismos, dentre eles a IL-10. Nossos resultados sugeriram que o
24 tratamento com células MSC WT conseguiu diminuir a resposta Th17 e aumentar a
25 citocina IL-10, gerando um ambiente antiinflamatório. Por outro lado, para evitar a
26 amplificação excessiva da resposta Th1, o óxido nítrico também pode induzir uma
27 população de células Treg que pode diminuir a resposta potencialmente prejudicial,
28 inclusive na colite experimental. Embora o mecanismo pelo qual o óxido nítrico
29 poderia converter células CD4⁺CD25⁻ efetoras em células T CD4⁺CD25⁺
30 reguladoras não seja ainda totalmente elucidado, a indução de células Tregs via
31 óxido nítrico poderia representar um meio importante através do qual os hospedeiros

1 mamíferos regulam a resposta imune para atingir um estado de homeostase
2 (NIEDBALA et al., 2006; 2007).

3 A diferenciação das células TCD4 naive em células Th2 é iniciada a partir da
4 sinalização de citocinas como IL-4, que eleva a própria produção desta citocina e
5 também a de IL-5, as quais levam à geração de eosinófilos, seguido por uma
6 regulação positiva de GATA-3 e ativação de fatores de transcrição que desativam
7 outras vias, como a da IL-17 (ZHU et al., 2010). Em adição, células T ativadas *in*
8 *vitro*, em co-cultura com MSC diminuíram a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17,
9 com aumento dos níveis de citocinas antiinflamatórias, tais como IL-4 e IL-10
10 (ZAPPIA et al., 2005). Ainda, corroborando com nossos achados que mostram
11 aumento tardio de IL-6 nos camundongos tratados com MSC iNOS^{-/-}, estudos
12 realizados por Djouad et al., demonstraram que MSC pode produzir IL-6 impedindo a
13 maturação de células dendríticas, uma importante APC, auxiliando inclusive, na
14 imunorregulação (DJOUAD et al., 2007). A IL-1 β se mostrou aumentada nos animais
15 tratados e reduzida naqueles que não receberam tratamento, no decorrer do período
16 experimental avaliado. Estes dados sugeriram que a produção de IL-1 β no colon
17 inflamado pode ter sido perpetuada pela infusão de MSC, independentemente de
18 NO. É sabido que o aumento da IL-1 β está relacionada com a DII experimental e
19 humana, em contrapartida Nemoto Y et al. observaram que ao infundirem MSC pode
20 haver também no inoculo alguns leucócitos ativados (NEMOTO et al., 2008). Nesse
21 contexto Godói et al. também observaram um aumento de IL-1 β no intestino dos
22 animais transplantados sugerindo da mesma forma, pode ter ocorrido uma reação
23 imunológica por células ativadas transplantadas juntamente com as células tronco
24 de medula óssea, explicando o aumento da IL-1 β nos animais tratados (GODOI et
25 al., 2012). Convém ressaltar que apesar deste aumento, o tratamento com MSC foi
26 eficaz para a melhora clínica e histopatológica da DII.

27 Macrófagos ativados são a principal fonte de IL-12, que é estimulador natural
28 de células NK e células dendríticas, sendo ainda capazes de induzir a produção
29 de IFN- γ por linfócitos (CHAN et al., 1991). Nossos dados sugerem que, em 3 dias, o
30 tratamento com MSC não conseguiu diminuir e, ao contrário o tratamento com MSC
31 WT aumentou os níveis de IL-12 no cólon. Este aumento inicial de IL-12 poderia
32 sugerir suposta potencialização da capacidade de apresentação de antígenos e

1 consequente ativação de células T pós-infusão de MSC, embora os efeitos
2 imunossupressores desta terapia tenham sido mais evidentes. Raphaëlle Romieu-
3 Mourez et al. sugeriram que a infusão intravenosa de MSC alogeneica em um
4 ambiente inflamatório aumenta a capacidade destas células de apresentar funções
5 relacionadas com a apresentação de antígenos em um contexto pró-inflamatório,
6 com aumento de citocinas como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , podendo prejudicar suas
7 propriedades supressivas (ROMIEU-MOUREZ et al., 2007). Estes achados vem
8 parcialmente de encontro a nossas observações de aumento de IL-1 β e IL-12 nos
9 animais tratados com MSC, mesmo naqueles que receberam células iNOS^{-/-},
10 sugerindo ser um efeito que ocorre mesmo na ausência de NO nas MSC. Porém,
11 este aumento de citocinas pró-inflamatórias parece não ter influenciado a resolução
12 da doença, pós-tratamento com MSC.

13 Finalizando, nossos achados fortalecem a descrição de outros
14 pesquisadores, no sentido de que células MSC apresentam eficácia no tratamento
15 das DII. Estas células agem diminuindo sinais clínicos, aumentando peso e
16 sobrevida, diminuindo o infiltrado inflamatório no sítio da inflamação, remodelando a
17 arquitetura intestinal e alterando perfis de resposta imunológica pró-inflamatória para
18 um perfil mais brando e imunorregulador. De forma interessante, vimos que as
19 células MSC iNOS^{-/-} também foram eficientes no controle da DII. Os caminhos que
20 levam à modulação da resposta inflamatória pelo transplante alogênico de células
21 MSC WT e MSC iNOS^{-/-} são distintos, porém ambos eficientes. Em resumo, nosso
22 estudo traz importantes contribuições na elucidação dos mecanismos que medeiam
23 o potencial terapêutico das MSC na DII.

24

6 CONCLUSÕES

- 1 1. As MSC provenientes da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT ou
2 iNOS^{-/-} apresentaram aderência, marcadores de superfície e capacidade de
3 diferenciação multipotencial, embora a diferenciação osteogênica seja
4 dependente de NO.
- 5 2. As MSC são eficientes na terapia da DII de forma independente de NO;
6 porém a produção de NO por MSC é capaz de alterar diferencialmente o
7 acúmulo de leucócitos no intestino e no sangue periférico dos camundongos
8 tratados, assim como a resposta inflamatória local.
- 9 3. As MSC competentes na produção de NO parem ser capazes de inibir a
10 resposta IL-17-dependente e induzir regulação via IL-10, enquanto na
11 ausência de NO a resposta imune intestinal é modulada via padrão Th2.

6 REFERÊNCIAS

- 1 Adas, G., S. Arikan, et al. Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic
2 colonic anastomoses (experimental study). **Langenbecks Arch Surg**, v. 396, n. 1,
3 p.115-126, 2011.
- 4 Alex, P., N. C. Zachos, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex
5 profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 3,
6 p.341-352, 2009.
- 7 Amorim, F. M., Y. K. Rodrigues, et al. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro
8 activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6
9 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. n. p.1-10, 2012.
- 10 Anand, A. C. and C. M. Adya. Cytokines and inflammatory bowel disease. **Trop**
11 **Gastroenterol**, v. 20, n. 3, p.97-106, 1999.
- 12 Atarashi, K., J. Nishimura, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation.
13 **Nature**, v. 455, n. 7214, p.808-812, 2008.
- 14 Bacchetta, R., L. Passerini, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in
15 patients with FOXP3 mutations. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p.1713-1722, 2006.
- 16 Baksh, D., R. Yao, et al. Comparison of proliferative and multilineage differentiation
17 potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone
18 marrow. **Stem Cells**, v. 25, n. 6, p.1384-1392, 2007.
- 19 Bamba, S., C. Y. Lee, et al. Bone marrow transplantation ameliorates pathology in
20 interleukin-10 knockout colitic mice. **J Pathol**, v. 209, n. 2, p.265-273, 2006.
- 21 Barbagallo, I., A. Vanella, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 increases
22 human osteoblast stem cell differentiation. **J Bone Miner Metab**, v. 28, n. 3, p.276-
23 288, 2010.
- 24 Bartholomew, A., D. Sher, et al. Stem cell transplantation eliminates alloantibody in a
25 highly sensitized patient. **Transplantation**, v. 72, n. 10, p.1653-1655, 2001.
- 26 Bassi, E. J., C. A. Aita, et al. Immune regulatory properties of multipotent
27 mesenchymal stromal cells: Where do we stand? **World J Stem Cells**, v. 3, n. 1, p.1-
28 8, 2011.
- 29 Beckman, J. S. and W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the
30 good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p.C1424-1437, 1996.
- 31 Ben-Ami, E., S. Berrih-Aknin, et al. Mesenchymal stem cells as an
32 immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**,
33 v. 10, n. 7, p.410-415, 2011.
- 34 Bischoff, S. C., J. Wedemeyer, et al. Quantitative assessment of intestinal
35 eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. **Histopathology**, v. 28, n.
36 1, p.1-13, 1996.

-
- 1 Boirivant, M., I. J. Fuss, et al. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type
2 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. **J Exp Med**, v. 188, n. 10, p.1929-
3 1939, 1998.
- 4 Bouffi, C., C. Bony, et al. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells
5 inhibits local inflammation in experimental arthritis. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p.e14247,
6 2010.
- 7 Bouma, G. and W. Strober. The immunological and genetic basis of inflammatory
8 bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 7, p.521-533, 2003.
- 9 Brennan, P. A., T. Umar, et al. Nitric oxide synthase expression is downregulated in
10 basal cell carcinoma of the head and neck. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 6,
11 p.633-636, 2000.
- 12 Brittan, M., V. Chance, et al. A regenerative role for bone marrow following
13 experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts.
14 **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p.1984-1995, 2005.
- 15 Canto, E., E. Ricart, et al. TNF alpha production to TLR2 ligands in active IBD
16 patients. **Clin Immunol**, v. 119, n. 2, p.156-165, 2006.
- 17 Carlson, M., Y. Raab, et al. Increased intraluminal release of eosinophil granule
18 proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental
19 perfusion. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 7, p.1876-1883, 1999.
- 20 Carrion, F., E. Nova, et al. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T
21 regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus
22 erythematosus patients. **Lupus**, v. 19, n. 3, p.317-322, 2010.
- 23 Chabannes, D., M. Hill, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive
24 effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p.3691-
25 3694, 2007.
- 26 Chamberlain, G., J. Fox, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their
27 phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.
28 **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p.2739-2749, 2007.
- 29 Chan, S. H., B. Perussia, et al. Induction of interferon gamma production by natural
30 killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with
31 other inducers. **J Exp Med**, v. 173, n. 4, p.869-879, 1991.
- 32 Chen, Y., M. Sjolinder, et al. Thyroid hormone enhances nitric oxide-mediated
33 bacterial clearance and promotes survival after meningococcal infection. **PLoS One**,
34 v. 7, n. 7, p.e41445, 2012.
- 35 Cho, W. S. and C. Chae. Expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase 2
36 in swine ulcerative colitis caused by *Salmonella typhimurium*. **Vet Pathol**, v. 41, n. 4,
37 p.419-423, 2004.

-
- 1 Ciccocioppo, R., M. L. Russo, et al. Mesenchymal stromal cell infusions as rescue
2 therapy for corticosteroid-refractory adult autoimmune enteropathy. **Mayo Clin Proc**,
3 v. 87, n. 9, p.909-914, 2012.
- 4 Cohen, R. D. The cost of Crohn's disease: drugs or surgery? **BioDrugs**, v. 14, n. 5,
5 p.331-344, 2000.
- 6 Dejaco, C., W. Reinisch, et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-10 on
7 lymphocyte phenotypes and leukocyte activation markers in inflammatory bowel
8 disease. **J Investig Med**, v. 48, n. 6, p.449-456, 2000.
- 9 Ding, S. and P. G. Schultz. A role for chemistry in stem cell biology. **Nat Biotechnol**,
10 v. 22, n. 7, p.833-840, 2004.
- 11 Dominici, M., K. Le Blanc, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal
12 stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.
13 **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p.315-317, 2006.
- 14 Duijvestein, M., A. C. Vos, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal
15 stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I
16 study. **Gut**, v. 59, n. 12, p.1662-1669, 2010.
- 17 Elliott, S. N. and J. L. Wallace. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and
18 injury. **J Gastroenterol**, v. 33, n. 6, p.792-803, 1998.
- 19 Elson, C. O., Y. Cong, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease
20 reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the
21 microbiota. **Immunol Rev**, v. 206, n. p.260-276, 2005.
- 22 Endemann, G., Y. Abe, et al. Novel anti-inflammatory compounds induce shedding of
23 L-selectin and block primary capture of neutrophils under flow conditions. **J**
24 **Immunol**, v. 158, n. 10, p.4879-4885, 1997.
- 25 English, K., F. P. Barry, et al. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell
26 migration, maturation and antigen presentation. **Immunol Lett**, v. 115, n. 1, p.50-58,
27 2008.
- 28 Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications. **Chin**
29 **J Dig Dis**, v. 6, n. 1, p.6-9, 2005.
- 30 Foell, D., T. Kucharzik, et al. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is
31 strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, n.
32 6, p.847-853, 2003.
- 33 Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. The development of fibroblast colonies in
34 monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**,
35 v. 3, n. 4, p.393-403, 1970.
- 36 Fujino, S., A. Andoh, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory
37 bowel disease. **Gut**, v. 52, n. 1, p.65-70, 2003.

-
- 1 Fuss, I. J., M. Neurath, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine
2 secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest
3 increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest
4 increased secretion of IL-5. **J Immunol**, v. 157, n. 3, p.1261-1270, 1996.
- 5 Geboes, K. and G. De Hertogh. Indeterminate colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 9, n. 5,
6 p.324-331, 2003.
- 7 Gillberg, L., M. Varsanyi, et al. Nitric oxide pathway-related gene alterations in
8 inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. n. 2012.
- 9 Godoi, D. F., C. R. Cardoso, et al. Hematopoietic SCT modulates gut inflammation in
10 experimental inflammatory bowel disease. **Bone Marrow Transplant**, v. 45, n. 10,
11 p.1562-1571, 2010.
- 12 Godoi, D. F., C. R. Cardoso, et al. Reappraisal of total body irradiation followed by
13 bone marrow transplantation as a therapy for inflammatory bowel disease.
14 **Immunobiology**, v. n. 2012.
- 15 Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, et al. Human adult stem cells derived from adipose
16 tissue protect against experimental colitis and sepsis. **Gut**, v. 58, n. 7, p.929-939,
17 2009.
- 18 Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells
19 alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses.
20 **Gastroenterology**, v. 136, n. 3, p.978-989, 2009.
- 21 Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, et al. Treatment of experimental arthritis by
22 inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells.
23 **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 4, p.1006-1019, 2009.
- 24 Guagnozzi, D. and A. J. Lucendo. Colorectal cancer surveillance in patients with
25 inflammatory bowel disease: What is new? **World J Gastrointest Endosc**, v. 4, n. 4,
26 p.108-116, 2012.
- 27 Hanauer, S. B. and F. Baert. Medical therapy of inflammatory bowel disease. **Med**
28 **Clin North Am**, v. 78, n. 6, p.1413-1426, 1994.
- 29 Hare, J. M., J. H. Traverse, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled,
30 dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells
31 (prochymal) after acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 24,
32 p.2277-2286, 2009.
- 33 Hayashi, Y., S. Tsuji, et al. The transdifferentiation of bone-marrow-derived cells in
34 colonic mucosal regeneration after dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice.
35 **Pharmacology**, v. 80, n. 4, p.193-199, 2007.
- 36 He, X. W., X. S. He, et al. Systemic Infusion of Bone Marrow-Derived Mesenchymal
37 Stem Cells for Treatment of Experimental Colitis in Mice. **Dig Dis Sci**, v. n. 2012.

-
- 1 Helio, T., L. Halme, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly
2 occurring and complicated forms of Crohn's disease. **Gut**, v. 52, n. 4, p.558-562,
3 2003.
- 4 Heller, F., I. J. Fuss, et al. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling
5 ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. **Immunity**, v. 17, n. 5,
6 p.629-638, 2002.
- 7 Herfarth, H. and J. Scholmerich. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroads.
8 Treatment of Crohn's disease with the anti-inflammatory cytokine interleukin 10. **Gut**,
9 v. 50, n. 2, p.146-147, 2002.
- 10 Hibi, T., H. Ogata, et al. Animal models of inflammatory bowel disease. **J**
11 **Gastroenterol**, v. 37, n. 6, p.409-417, 2002.
- 12 Himmel, M. E., Y. Yao, et al. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel
13 disease: more questions than answers. **Immunology**, v. 136, n. 2, p.115-122, 2012.
- 14 Hof-Nahor, I., L. Leshansky, et al. Human mesenchymal stem cells shift CD8+ T cells
15 towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes. **J Cell Sci**, v.
16 n. 2012.
- 17 Horwitz, E. M. MSC: a coming of age in regenerative medicine. **Cytotherapy**, v. 8, n.
18 3, p.194-195, 2006.
- 19 Huang, H., P. Martasek, et al. Synthesis and evaluation of peptidomimetics as
20 selective inhibitors and active site probes of nitric oxide synthases. **J Med Chem**, v.
21 43, n. 15, p.2938-2945, 2000.
- 22 Ishihara, T., K. Tanaka, et al. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase
23 against colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 328, n. 1, p.152-164, 2009.
- 24 Jiang, X., P. Cui, et al. [Study on the directed inducing process of cartilage cells
25 differentiated from human marrow mesenchymal stem cells]. **Zhonghua Er Bi Yan**
26 **Hou Ke Za Zhi**, v. 37, n. 2, p.137-139, 2002.
- 27 Joo, S. Y., K. A. Cho, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host
28 disease of mice in a dose-dependent manner. **Cytotherapy**, v. 12, n. 3, p.361-370,
29 2010.
- 30 Kamada, N., T. Hisamatsu, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to
31 the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. **J Clin Invest**, v. 118,
32 n. 6, p.2269-2280, 2008.
- 33 Kang, S. K., I. S. Shin, et al. Journey of mesenchymal stem cells for homing:
34 strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. **Stem Cells Int**, v.
35 2012, n. p.342968, 2012.
- 36 Kaser, A., S. Zeissig, et al. Inflammatory bowel disease. **Annu Rev Immunol**, v. 28,
37 n. p.573-621, 2010.

-
- 1 Kassem, M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical
2 applications. **Cloning Stem Cells**, v. 6, n. 4, p.369-374, 2004.
- 3 Kastrinaki, M. C., P. Sidiropoulos, et al. Functional, molecular and proteomic
4 characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis.
5 **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 6, p.741-749, 2008.
- 6 Khalil, P. N., V. Weiler, et al. Nonmyeloablative stem cell therapy enhances
7 microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease.
8 **Gastroenterology**, v. 132, n. 3, p.944-954, 2007.
- 9 Kim, Y. S., M. H. Lee, et al. Th17 responses are not induced in dextran sodium
10 sulfate model of acute colitis. **Immune Netw**, v. 11, n. 6, p.416-419, 2011.
- 11 Kjeldsen, J., O. B. Schaffalitzky de Muckadell, et al. Seromarkers of collagen I and III
12 metabolism in active Crohn's disease. Relation to disease activity and response to
13 therapy. **Gut**, v. 37, n. 6, p.805-810, 1995.
- 14 Klyushnenkova, E., J. D. Mosca, et al. T cell responses to allogeneic human
15 mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. **J Biomed**
16 **Sci**, v. 12, n. 1, p.47-57, 2005.
- 17 Koizumi, M., N. King, et al. Expression of vascular adhesion molecules in
18 inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 103, n. 3, p.840-847, 1992.
- 19 Kolios, G., N. Rooney, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in
20 human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. **Gut**, v.
21 43, n. 1, p.56-63, 1998.
- 22 Komori, M., S. Tsuji, et al. Efficiency of bone marrow-derived cells in regeneration of
23 the stomach after induction of ethanol-induced ulcers in rats. **J Gastroenterol**, v. 40,
24 n. 6, p.591-599, 2005.
- 25 Konkel, J. E. and W. Chen. Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal
26 immune system. **Trends Mol Med**, v. 17, n. 11, p.668-676, 2011.
- 27 Koyama, N., Y. Okubo, et al. Experimental study of osteoinduction using a new
28 material as a carrier for bone morphogenetic protein-2. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.
29 49, n. 4, p.314-318, 2011.
- 30 Krampera, M., L. Cosmi, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory
31 activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2,
32 p.386-398, 2006.
- 33 Lampinen, M., M. Carlson, et al. IL-5 and TNF-alpha participate in recruitment of
34 eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. **Dig Dis Sci**, v. 46, n. 9, p.2004-
35 2009, 2001.
- 36 Le Blanc, K., F. Frassoni, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-
37 resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**, v. 371,
38 n. 9624, p.1579-1586, 2008.
-

-
- 1 Le Blanc, K., L. Tammik, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed
2 lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major
3 histocompatibility complex. **Scand J Immunol**, v. 57, n. 1, p.11-20, 2003.
- 4 Lee, R. H., M. J. Seo, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to
5 and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice.
6 **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 46, p.17438-17443, 2006.
- 7 Li, W., G. Ren, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating
8 immune responses. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 9, p.1505-1513, 2012.
- 9 Liang, J., H. Zhang, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in
10 refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. **Ann Rheum Dis**, v.
11 69, n. 8, p.1423-1429, 2010.
- 12 Liao, P. H., Y. H. Hsu, et al. Involvement of extraneural tissues and upregulation of
13 inducible nitric oxide synthase after experimental infection with rabies virus in BALB/c
14 mice and LEW/SsN rats. **Pathol Int**, v. 62, n. 9, p.619-627, 2012.
- 15 Mais, A., T. Klein, et al. Prostanoid pattern and iNOS expression during chondrogenic
16 differentiation of human mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem**, v. 98, n. 4, p.798-
17 809, 2006.
- 18 Manocha, M., S. Rietdijk, et al. Blocking CD27-CD70 costimulatory pathway
19 suppresses experimental colitis. **J Immunol**, v. 183, n. 1, p.270-276, 2009.
- 20 Marigo, I. and F. Dazzi. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem
21 cells. **Semin Immunopathol**, v. 33, n. 6, p.593-602, 2011.
- 22 Matsumoto, T., R. Okamoto, et al. Increase of bone marrow-derived secretory
23 lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine.
24 **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p.1851-1867, 2005.
- 25 Mayer, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **J Gastroenterol**, v. 45, n.
26 1, p.9-16, 2010.
- 27 Mazzone, A., V. Bronte, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an
28 NO-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 168, n. 2, p.689-695, 2002.
- 29 Moncada, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J R Soc Med**, v.
30 92, n. 4, p.164-169, 1999.
- 31 Monteleone, G., L. Biancone, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released
32 by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. **Gastroenterology**,
33 v. 112, n. 4, p.1169-1178, 1997.
- 34 Monteleone, I., F. Pallone, et al. Th17-cytokine blockers as a new approach for
35 treating inflammatory bowel disease. **Ann Med**, v. 43, n. 3, p.172-178, 2011.

- 1 Mow, W. S., E. A. Vasilias, et al. Association of antibody responses to microbial
2 antigens and complications of small bowel Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.
3 126, n. 2, p.414-424, 2004.
- 4 Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J**, v. 6, n.
5 12, p.3051-3064, 1992.
- 6 Nauta, A. J., A. B. Kruisselbrink, et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and
7 function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol**, v.
8 177, n. 4, p.2080-2087, 2006.
- 9 Nemeth, K., B. Mayer, et al. Modulation of bone marrow stromal cell functions in
10 infectious diseases by toll-like receptor ligands. **J Mol Med (Berl)**, v. 88, n. 1, p.5-10,
11 2010.
- 12 Nemoto, Y., T. Kanai, et al. Negative feedback regulation of colitogenic CD4+ T cells
13 by increased granulopoiesis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, n. 11, p.1491-1503, 2008.
- 14 Neuman, M. G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Transl Res**, v.
15 149, n. 4, p.173-186, 2007.
- 16 Neurath, M. F., I. Fuss, et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established
17 experimental colitis in mice. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p.1281-1290, 1995.
- 18 Niedbala, W., J. C. Alves-Filho, et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by
19 nitric oxide during inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p.9220-
20 9225, 2011.
- 21 Niedbala, W., B. Cai, et al. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions.
22 **Ann Rheum Dis**, v. 65 Suppl 3, n. p.iii37-40, 2006.
- 23 Niedbala, W., B. Cai, et al. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells
24 from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104,
25 n. 39, p.15478-15483, 2007.
- 26 Ogura, Y., D. K. Bonen, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with
27 susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n. 6837, p.603-606, 2001.
- 28 Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. A novel method in the induction of reliable
29 experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n.
30 3, p.694-702, 1990.
- 31 Oliveira, F. M., A. P. Emerick, et al. [Epidemiology aspects of inflammatory bowel
32 disease in the east region of Minas Gerais State]. **Cien Saude Colet**, v. 15 Suppl 1,
33 n. p.1031-1037, 2010.
- 34 Park, H., Z. Li, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by
35 producing interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p.1133-1141, 2005.
- 36 Parrello, T., G. Monteleone, et al. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in
37 Crohn's disease. **J Immunol**, v. 165, n. 12, p.7234-7239, 2000.

-
- 1 Peister, A., J. A. Mellad, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated
2 from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation,
3 and differentiation potential. **Blood**, v. 103, n. 5, p.1662-1668, 2004.
- 4 Peterson, C. G., E. Eklund, et al. A new method for the quantification of neutrophil
5 and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical
6 application in patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 97,
7 n. 7, p.1755-1762, 2002.
- 8 Petnicki-Ocwieja, T., T. Hrncir, et al. Nod2 is required for the regulation of
9 commensal microbiota in the intestine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 37,
10 p.15813-15818, 2009.
- 11 Podolsky, D. K. The current future understanding of inflammatory bowel disease.
12 **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 16, n. 6, p.933-943, 2002.
- 13 Qian, H., K. Le Blanc, et al. Primary Mesenchymal Stem and Progenitor Cells from
14 Bone Marrow Lack Expression of CD44 Protein. **J Biol Chem**, v. 287, n. 31,
15 p.25795-25807, 2012.
- 16 Rachmilewitz, D., R. Eliakim, et al. Direct determination of colonic nitric oxide level--a
17 sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n.
18 3, p.409-412, 1998.
- 19 Ren, G., L. Zhang, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression
20 occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 2,
21 p.141-150, 2008.
- 22 Ren, G., X. Zhao, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion
23 molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are
24 critical for immunosuppression. **J Immunol**, v. 184, n. 5, p.2321-2328, 2010.
- 25 Rolhion, N. and A. Darfeuille-Michaud. Adherent-invasive Escherichia coli in
26 inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 10, p.1277-1283, 2007.
- 27 Romieu-Mourez, R., M. Francois, et al. Regulation of MHC class II expression and
28 antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma,
29 TGF-beta, and cell density. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p.1549-1558, 2007.
- 30 Rothenberg, M. E., A. Mishra, et al. Gastrointestinal eosinophils in health and
31 disease. **Adv Immunol**, v. 78, n. p.291-328, 2001.
- 32 Round, J. L. and S. K. Mazmanian. The gut microbiota shapes intestinal immune
33 responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p.313-323, 2009.
- 34 Saalbach, A., U. F. Haustein, et al. A ligand of human thy-1 is localized on
35 polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated
36 thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v.
37 115, n. 5, p.882-888, 2000.

-
- 1 Saleh, M. and C. O. Elson. Experimental inflammatory bowel disease: insights into
2 the host-microbiota dialog. **Immunity**, v. 34, n. 3, p.293-302, 2011.
- 3 Sarra, M., F. Pallone, et al. IL-23/IL-17 axis in IBD. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 10,
4 p.1808-1813, 2010.
- 5 Sartor, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases.
6 **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p.577-594, 2008.
- 7 Sato, K., K. Ozaki, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell
8 proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 109, n. 1, p.228-234, 2007.
- 9 Scaldaferri, F. and C. Fiocchi. Inflammatory bowel disease: progress and current
10 concepts of etiopathogenesis. **J Dig Dis**, v. 8, n. 4, p.171-178, 2007.
- 11 Schirbel, A. and C. Fiocchi. Inflammatory bowel disease: Established and evolving
12 considerations on its etiopathogenesis and therapy. **J Dig Dis**, v. 11, n. 5, p.266-276,
13 2010.
- 14 Shaked, H., L. J. Hofseth, et al. Chronic epithelial NF-kappaB activation accelerates
15 APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. **Proc Natl Acad
16 Sci U S A**, v. 109, n. 35, p.14007-14012, 2012.
- 17 Sheng, Y. H., S. Z. Hasnain, et al. Mucins in inflammatory bowel diseases and
18 colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, n. 1, p.28-38, 2012.
- 19 Siegmund, B. and M. Zeitz. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel
20 disease. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 27, p.3178-3183, 2011.
- 21 Singer, N. G. and A. I. Caplan. Mesenchymal stem cells: mechanisms of
22 inflammation. **Annu Rev Pathol**, v. 6, n. p.457-478, 2011.
- 23 Smith, P. D., C. Ochsenbauer-Jambor, et al. Intestinal macrophages: unique effector
24 cells of the innate immune system. **Immunol Rev**, v. 206, n. p.149-159, 2005.
- 25 Sokol, H., B. Pigneur, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory
26 commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients.
27 **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 43, p.16731-16736, 2008.
- 28 Somerville, K. W., M. J. Langman, et al. Effect of treatment on symptoms and quality
29 of life in patients with ulcerative colitis: comparative trial of hydrocortisone acetate
30 foam and prednisolone 21-phosphate enemas. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 291, n.
31 6499, p.866, 1985.
- 32 Spaggiari, G. M., H. Abdelrazik, et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation
33 and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central
34 role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**, v. 113, n. 26, p.6576-6583, 2009.
- 35 Strober, W., I. J. Fuss, et al. The immunology of mucosal models of inflammation.
36 **Annu Rev Immunol**, v. 20, n. p.495-549, 2002.

- 1 Stuehr, D. J. and O. W. Griffith. Mammalian nitric oxide synthases. **Adv Enzymol**
2 **Relat Areas Mol Biol**, v. 65, n. p.287-346, 1992.
- 3 Summers, R. W., D. E. Elliott, et al. Trichuris suis seems to be safe and possibly
4 effective in the treatment of inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98,
5 n. 9, p.2034-2041, 2003.
- 6 Tanaka, F., K. Tominaga, et al. Exogenous administration of mesenchymal stem cells
7 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in
8 damaged tissue in rats. **Life Sci**, v. 83, n. 23-24, p.771-779, 2008.
- 9 Turner, C. H., I. Owan, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone
10 formation in rats. **Bone**, v. 21, n. 6, p.487-490, 1997.
- 11 Uccelli, A., L. Moretta, et al. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev**
12 **Immunol**, v. 8, n. 9, p.726-736, 2008.
- 13 Yang, X. O., S. H. Chang, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. **J**
14 **Exp Med**, v. 205, n. 5, p.1063-1075, 2008.
- 15 Zaltman, C. Inflammatory bowel disease: how relevant for Brazil? **Cad Saude**
16 **Publica**, v. 23, n. 5, p.992-993, 2007.
- 17 Zappia, E., S. Casazza, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental
18 autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. **Blood**, v. 106, n. 5, p.1755-
19 1761, 2005.
- 20 Zaragoza, C., E. Lopez-Rivera, et al. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-
21 13 in osteoblasts. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 9, p.1896-1902, 2006.
- 22 Zhu, J. and W. E. Paul. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Res**, v. 20,
23 n. 1, p.4-12, 2010.

7 ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de ética ao projeto

5

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

**Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS****IDENTIFICAÇÃO****TÍTULO DO PROJETO:** *Potencial terapêutico de células mesenquimais estromais na doença inflamatória intestinal.***PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Cristina Ribeiro de Barros Cardoso**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM**DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM:** 08/12/2008**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 106

manipular os animais, seguindo as orientações da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório antigo COBEA.

Todos os procedimentos cirúrgicos são realizados em capela de fluxo laminar horizontal, previamente esterilizados seguindo normas padronizadas de uso da capela. Os instrumentais cirúrgicos utilizados nos procedimentos serão colocados, após seu uso, em solução de hipoclorito para desinfecção e, a continuação, lavados em água corrente e detergente neutro e em seguida, serão colocados em estufa para sua esterilização. Materiais descartáveis, como seringas, lâminas de bisturi e agulhas serão desprezados em recipiente próprio de materiais perfuro-cortantes.

9. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA E FONTE DE RECURSOS

Descrito um Total de R\$100.000,00.

10. CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA

Não se aplica.

11. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS


Para o pesquisador e seus colaboradores, o projeto visa o desenvolvimento de novas terapias para as doenças inflamatórias/auto-imunes crônicas e recidivantes, em especial as DII, com base na utilização de MSCs. Além do entendimento da patogênese e da modulação da resposta imune nas DII, os resultados esperados compreendem o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essas doenças e a validação de futuros ensaios clínicos. Sendo assim, este projeto visa proporcionar bases científicas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da colite ulcerativa e/ou doença de Crohn.

12. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Protocolo adequado segundo parâmetros éticos.

PARECER DA CEUA: Aprovado.*(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).*

DATA DA REUNIÃO: 10/12/2010


Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari
Coordenador da CEUA

Anexo 2 - Parecer do Comitê de ética ao adendo

Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Frei Paulino nº 30 – 2º andar - Sala A1 – CEA-Centro Educacional e Administrativo – Bairro Abadia
CEP: 38025-180 – Uberaba-MG - Telefax: (0**34) 3318 5082 - E-mail: ceua@pesqppg.uftm.edu.br

D E C L A R A Ç Ã O

Declaro para os devidos fins que o adendo ao projeto nº 106 foi aprovado em reunião desta CEUA no dia 25/11/2011, acrescentando assim o uso dos seguintes animais:

- 75 camundongos Balb/c fêmeas;
- 10 camundongos C57BL/6 selvagens;
- 10 camundongos C57BL/6 iNOS^{-/-};
- 10 camundongos C57BL/6 GFP.

Uberaba, 02 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari

Coordenador da CEUA/UFTM