



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Vanessa Beatriz Freitas Alves

**Potencial terapêutico do transplante xenogênico de células
estromais mesenquimais multipotentes na
Doença Inflamatória Intestinal**

UBERABA - MG
2011

VANESSA BEATRIZ FREITAS ALVES

Potencial terapêutico do transplante xenogênico de células estromais mesenquimais multipotentes na Doença Inflamatória Intestinal

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração II: Imunologia, Parasitologia e Microbiologia.

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

UBERABA – MG
2011

Dedicatória

À minha mãe Hilda, meu pai Hiron e meu irmão Claudiney por todo carinho e apoio irrestrito nesta trajetória, propiciando as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

A **Deus**, meu Pai Eterno que me dá proteção e força para vencer todas as dificuldades que encontro.

Aos **pacientes saudáveis** que aceitaram participar desta pesquisa, unicamente pelo bem da ciência.

À **minha orientadora** Prof^a Dr^a Cristina de Barros Cardoso, por estar sempre presente e me ensinando com paciência e compreensão.

Aos meus **colaboradores** da pesquisa, **minha co-orientadora** Prof^a Dr^a Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, aos Profs. Dr. Javier Lazo Chica, Dr. Virmondes Rodrigues Júnior, Dr. João Santana Silva, Dr. Júlio César Voltarelli, e as alunas, especialmente à Beatriz Coutinho e Haline Ogata que além da dedicação com a pesquisa são grandes amigas, e Monique Fonseca.

Aos **professores, colegas de mestrado e do Laboratório de Imunologia**, pelo que compartilhamos durante nosso crescimento.

A Jane Freitas, **minha prima e amiga**, por sempre me apoiar, por me influenciar positivamente.

À **família** e amigos por acreditarem na minha escolha, me ajudando e incentivando e por terem compreendido minha ausência.

"Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo. Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo. Continue, quando todos esperam que desistas. Não deixe que enferruje o ferro que existe em você. Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você. Quando não conseguir correr através dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca se detenha."

Madre Teresa de Calcutá

Alves VBF. Potencial terapêutico do transplante xenogênico de células mesenquimais estromais na Doença Inflamatória Intestinal. [dissertação]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.

RESUMO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, são caracterizadas por inflamação crônica descontrolada da mucosa intestinal. Enquanto a colite ulcerativa apresenta-se com resposta Th2, pacientes com doença de Crohn apresentam resposta Th1 e, recentemente, descobriu-se a presença de células Th17 na mucosa inflamada, além de falhas no processo de imunorregulação, por células T reguladoras (Tregs). Embora as terapias atuais sejam direcionadas a estes elementos da cascata imuno-inflamatória, nenhum tratamento é, no momento, totalmente efetivo, sendo evidente a necessidade de novas terapias para o controle da progressão das DII. As células mesenquimais estromais (MSCs) são células multipotentes com grande capacidade imunossupressora e reguladora, com importantes perspectivas terapêuticas para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias. Sendo assim, este estudo pré-clínico avaliou o potencial terapêutico de MSCs humanas na DII induzida experimentalmente. As MSCs foram isoladas, cultivadas e caracterizadas a partir de tecido adiposo de doadores saudáveis (adMSC). A DII foi induzida em camundongos BALB/c com injeção intrarretal de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e, após indução da doença, os animais foram tratados com MSC e eutanasiados nos dias 3, 7, 14 e 60 pós-transplante, para a coleta de segmentos intestinais, baço e linfonodos mesentéricos. Foram avaliados o peso, presença de diarreia, mortalidade e, por histopatologia, a resposta inflamatória intestinal de camundongos com DII antes e após o tratamento com MSC. A modulação da resposta imune intestinal foi averiguada com ênfase nas subpopulações de células Tregs e Th17. Além destas, as células do infiltrado inflamatório no intestino, baço e linfonodos foram quantificadas por citometria de fluxo. As citocinas na mucosa intestinal foram avaliadas por *Cytometric Bead Array* (CBA) e ELISA. Amostras de outros órgãos foram também coletadas com o intuito de se averiguar possíveis alterações histopatológicas pós-infusão de MSC, o que não foi detectado. Os resultados demonstraram que as adMSCs apresentaram marcadores de superfície, plasticidade e potencial supressor semelhante aos dados já descrito para MSCs. Houve controle aparente da inflamação intestinal pós-tratamento com MSC, com redução dos sinais clínicos da DII experimental. O infiltrado inflamatório na DII foi influenciado pelo tratamento com adMSC, com alterações específicas nas populações de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK, NKT e linfócitos T. O tratamento com adMSC induziu inversão do padrão de resposta imune intestinal, com aumento de regulação (Tregs) e resposta Th2 e redução de citocinas inflamatórias além da diminuição da população de células Th17. Finalmente, nossos resultados contribuíram para o entendimento da patogênese da DII no modelo de colite induzida por TNBS, da ação das MSC e de sua eficácia no tratamento dessas doenças, podendo ser uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da colite ulcerativa e/ou doença de Crohn.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal. Células mesenquimais estromais. Resposta Inflamatória. Terapia celular.

Alves VBF. Potencial terapêutico do transplante xenogênico de células mesenquimais estromais na Doença Inflamatória Intestinal. Therapeutic potential of xenogenic mesenchymal stromal cells transplantation in inflammatory bowel disease [dissertation]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis, are characterized by uncontrolled chronic inflammation of the intestinal mucosa. While ulcerative colitis is characterized by Th2 immune response, patients with Crohn's disease show Th1 reactions. The newly discovered Th17 responses are also involved in IBD pathogenesis, along with a lack or absence of regulation by regulatory T cells (Tregs) in inflamed mucosa. Although current therapies are directed at the immuno-inflammatory responses, no treatment is fully effective and it is evident that novel therapies are still needed for controlling IBD progression. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotent cells with regulatory immunosuppressive activities, thus becoming an important therapeutic tool for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. Therefore, this preclinical study evaluated the therapeutic potential of human MSCs in experimentally induced IBD. The MSCs were isolated, cultured and characterized from adipose tissue of healthy donors (adMSC). IBD was induced in BALB/c mice injected with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) by intrarectal route. After that, mice were treated with MSC and euthanized on days 3, 7, 14 and 60 post-transplant for the collection of intestinal segments, spleen and mesenteric lymph nodes. We evaluated the weight, presence of diarrhea, mortality, and by histopathology, the intestinal inflammatory response of mice with IBD in the presence or absence of treatment with MSC. The modulation of the intestinal immune response was evaluated with emphasis on the subpopulations of Tregs and Th17 cells. Additionally, the inflammatory cells in the intestine, spleen and lymph nodes were evaluated by flow cytometry. The colon cytokines were measured by Cytometric Bead Array (CBA) and ELISA. Samples of organs other than large gut were also collected in order to verify the possible pathological changes (not found) induced after MSCs transplantation. Results demonstrated that the adMSCs showed surface markers, plasticity and suppressor potential similar to other MSCs previously described. The intestinal inflammation was apparently controlled after MSC treatment, with reduced clinical signs of the experimentally induced IBD. The inflammatory infiltrate in IBD was influenced by treatment with adMSC, as demonstrated by changes in the population of neutrophils, eosinophils, macrophages, dendritic cells, NK/NKT cells and T lymphocytes. Moreover, treatment with adMSC induced an inversion of the pattern of inflamed gut immune response, with increased Tregs and Th2 responses along with a reduction in inflammatory cytokines and Th17 cells. Finally, our results contributed to the understanding of the pathogenesis of IBD in the TNBS-colitis model, to the adMSC activities and effectiveness in the treatment of these diseases and pointed to adMSC as novel therapeutic strategy for the treatment of ulcerative colitis and/ or Crohn's disease.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease. Mesenchymal stromal cells. Inflammatory response. Cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema de eutanásia para a coleta das amostras dos camundongos controles PBS e etanol, com a DII e tratados com as adMSCs.

FIGURA 2 - Caracterização imunofenotípica de células mesenquimais estromais (MSC) isoladas de tecido adiposo de indivíduo saudável.

FIGURA 3 - Fotomicrografias da diferenciação de MSC em osteoblastos e adipócitos *in vitro*, em terceira passagem (B e D).

FIGURA 4 - Efeito inibidor de MSCs isoladas de tecido adiposo na proliferação de linfócitos extraídos de indivíduo saudável.

FIGURA 5 - Avaliação do peso de camundongos BALB/c durante os primeiros dias após indução de doença inflamatória intestinal colite e tratamento com células mesenquimais estromais (adMSC).

FIGURA 6 – Consumo de ração.

FIGURA 7 - Avaliação do score clínico e sobrevida dos animais durante os primeiros dias após indução de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e tratamento com adMSC.

FIGURA 8 - Análise macroscópica do intestino grosso.

FIGURA 9 - Análise histopatológica do intestino grosso de animais controles com infusão de PBS.

FIGURA 10 - Análise histopatológica do intestino grosso de animais controles com infusão de etanol.

FIGURA 11 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais com colite.

FIGURA 12 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais aos 3 dias com colite tratados com as adMSCs.

FIGURA 13 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais aos 7 e 14 dias com colite tratados com as adMSCs.

FIGURA 14 – Comparação das análises histopatológicas do intestino grosso de animais com a colite e após tratamento com as adMSCs.

FIGURA 15 - Avaliação da atividade das enzimas eosinófilo-peroxidase (EPO) e mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos com colite e tratados com adMSC.

FIGURA 16 - Avaliação do infiltrado inflamatório após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 17 - Avaliação do infiltrado inflamatório dos linfonodos mesentéricos e baço após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 18 - Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 19 - Avaliação da frequência de linfócitos intraepiteliais após indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 20 - Detecção de células monocíticas nos camundongos após indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 21 - Frequência de células CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 22 - Quantificação de linfócitos T reguladores (FoxP3⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 23 - Quantificação de linfócitos T reguladores (PD-1⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 24 - Quantificação de linfócitos T reguladores (GITR⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 25 - Quantificação de linfócitos T reguladores (CTLA-4⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 26 - Quantificação de linfócitos T reguladores (CD45RB^{low}) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

FIGURA 27 - Avaliação do perfil de citocinas no cólon de camundongos com colite e tratados com adMSC.

FIGURA 28 - Quantificação de células Th17 dos linfonodos mesentéricos após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos usados para caracterização fenotípica dos leucócitos de baço, linfonodos mesentéricos e intestino.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

adMSC – Células mesenquimais estromais de tecido adiposo

BÇ – Baço

CTLA-4 – *Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen*

CCR – Receptor de quimiocina tipo CC

CD – *Cluster* de diferenciação

CFSE – *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester*

CBA – *Cytometric Bead Array*

CARD15 – *Caspase recruitment domain*

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

EAE – Encefalomielite autoimune experimental

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPO – Eosinófilo-Peroxidase

FITC – *Fluorescein isothiocyanate*

Foxp3 – *Forkhead box P3*

FSC – Tamanho das células

GITR – *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*

GFP – Proteína verde fluorescente

GVHD – Doença do enxerto versus hospedeiro

HTAB – Brometo de Hexadecil –Trimetil Amônio

H&E – Hematoxilina e eosina

IEL – Linfócitos intraepiteliais

IFN- γ - Interferon γ

IL – Interleucina

ICAM –I - Moléculas de adesão celular do tipo 1

IL-R – Receptor de interleucina

i.p. – Intraperitoneal

i.r. – Intrarretal

LFA-3 – *Lymphocyte function-associated antigen-3*

LP – Lâmina própria

LN – Linfonodos mesentéricos

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MLR – Reação mista de linfócitos

MPO - Mieloperoxidase

MSC – Células mesenquimais estromais

NK - Células natural killer

NKT – Células natural killer T

NOD – *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NOS – Óxido nítrico sintase

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Solução salina tamponada em fosfato

PD-1- Programmed Cell Death 1

PE- *Phycoerythrin*

PeCy5 – *Phycoerythrin-Cy5*

PGE₂ – Prostaglandina E2

PHA – Fitohemaglutinina

ROR γ T – *Retinoic acid-related orphan receptor γ T*

SBF – Soro fetal bovino

SSC – Granulosidade das células

TACTH – Transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas

TCR – Receptor de células T

TGF- β – Fator de crescimento e transformação β

TGI – Trato gastrointestinal

Th – Linfócitos T helper

TNBS – Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

Tregs - Células T reguladoras

VCAM-I – *Vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2 ETIOPATOGENIA	15
1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DII	16
1.4 TRATAMENTO DA DII	20
1.5 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES	22
1.6. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 ANIMAIS	28
3.2 COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO 2,4,6 TRINITROBENZEDO SULFÔNICO (TNBS)	28
3.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO (adMSC)	29
3.4 CULTURA DAS adMSCs	29
3.5 IMUNOFENOTIPAGEM DE adMSCs	30
3.6 DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS adMSCs	30
3.7 ENSAIO DE COCULTIVO DAS adMSCs COM LINFÓCITOS	31
3.8 INFUSÃO DE adMSCs	32
3.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	32
3.10 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	33
3.11 ESCORE CLÍNICO	33
3.12 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	34
3.13 ENSAIO DE EOSINÓFILO-PEROXIDASE (EPO)	34
3.14 CITOMETRIA DE FLUXO	35
3.15 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	38
3.16 HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	39
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS	41
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS adMSCs	41

4.2 RESULTADOS CLÍNICOS	46
4.3 ANÁLISES MACROSCÓPICAS E HISTOLÓGICAS	49
4.4 QUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO.....	61
4.4.1 Neutrófilos e eosinófilos	61
4.4.2 Leucócitos e células CD3 ⁺	63
4.4.3 Células NK, NKT e linfócitos T	64
4.4.4 Linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	65
4.4.5 Células monocíticas	67
4.4.6 Células T reguladoras	68
4.4.7 Perfil de citocinas	78
4.4.8 Linfócitos Th17	80
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) afetam milhares de pessoas em todo o mundo e são caracterizadas por inflamação crônica descontrolada da mucosa intestinal (Papadakis e Targan 1999), acompanhada de sinais e sintomas como dor abdominal, diarreia, sangramento retal e sintomas sistêmicos como perda de peso, febre e fadiga, além de obstrução intestinal e fístulas (Fuss, Heller et al., 2004). As DII são processos crônicos e recidivantes da mucosa do intestino, englobando dois principais subtipos que são a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Enquanto a doença de Crohn é caracterizada por ulceração descontínua que afeta camadas mais profundas de qualquer porção do trato gastrintestinal (TGI), frequentemente incluindo granuloma, a colite ulcerativa se caracteriza por inflamação e ulceração contínua da camada mais superficial do cólon. A inflamação acentuada que acomete o intestino pode levar a danos prolongados e ocasionalmente irreversíveis da função e estrutura gastrintestinal (Bouma e Strober, 2003). Ainda, essas doenças afetam a qualidade de vida dos pacientes, sendo capazes de desencadear o desenvolvimento de outras doenças como câncer cólon-retal (Russel e Stockbrugger, 1996, Norman, Kirchner et al., 2006).

1.2 ETIOPATOGENIA

A etiologia das DII ainda não está clara, mas sabe-se que esta é uma doença multifatorial que envolve susceptibilidade genética, sistema imune e meio ambiente (Schreiber, 2000, Vieth e Tannapfel, 2006). Alguns fatores genéticos que desencadeiam a doença já foram estabelecidos, como polimorfismos no gene CARD15 (*caspase recruitment domain*) que codifica o receptor NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) (Hugot, Chamaillard et al., 2001, Ogura, Bonen et al., 2001). Quanto aos fatores imunológicos, é provável que mecanismos autoimunes, como produção de auto-anticorpos, induzam danos teciduais através de citotoxicidade mediada por anticorpos. É sabido que pacientes com DII possuem anticorpos contra vários autoantígenos potenciais, como antígenos linfocitários

(Korsmeyer, Strickland et al., 1974), proteínas de citoesqueleto (Mayet, Press et al., 1990), cardiolipina (Aichbichler, Petritsch et al., 1999) e proteínas pancreáticas (Fricke, Birkhofer et al. 1999).

A mucosa intestinal pode ser considerada como uma das partes mais exposta a antígenos, sendo colonizada por mais de 400 espécies diferentes de bactérias comensais que têm a função de facilitar a digestão (Sepulveda, Beltran et al., 2008). Sendo assim, o sistema imune de mucosa é distinto, sendo capaz, normalmente, de diferenciar bactérias comensais de patogênicas (Mowat, 2003), gerando respostas adequadas de tolerância, na maioria das vezes (Liu e Lefrancois, 2004). Neste contexto, as DII são consideradas também uma interação disfuncional entre a microflora do intestino e o sistema imune das mucosas, podendo haver quebra na tolerância imunológica normal do TGI, por defeitos na população de células T efetoras que reagem contra antígenos microbianos habituais no intestino, diminuição da população de células T reguladoras (Tregs) que não modulam adequadamente as células T efetoras e, finalmente, uma alteração no número ou no tipo de microorganismos que compõem a microbiota intestinal, resultando em microorganismos capazes de desencadear uma resposta imune excessiva (Strober, Fuss et al., 2007).

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DII

A resposta inflamatória exacerbada na DII é caracterizada por infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos, monócitos/macrófagos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Geboes, 1994, Yang, Choi et al., 2002, Rijniere, Koster et al., 2006), com ocorrência de hiperplasia celular nas criptas, edema intersticial e ulcerações na mucosa intestinal (Krieglstein, Cerwinka et al., 2001). O recrutamento de leucócitos para o intestino é um processo essencial para o desenvolvimento da inflamação intestinal (Oshitani, Hato et al., 2002). Aqueles já presentes no tecido e os recrutados liberam mediadores que modulam o dano tecidual no sítio inflamatório (Geboes, 1994, Rijniere, Koster et al., 2006). Normalmente, a inflamação termina com o reparo tecidual. No entanto, nas DII o reparo não acontece ou é incompleto, as lesões precoces não cicatrizam e levam à inflamação crônica. Neste processo, há um desequilíbrio entre os linfócitos T

efetores e reguladores (Tregs) que iriam suprimir a resposta, provavelmente por um defeito no repertório das células Tregs e, como consequência, a expansão das células T supostamente autorreativas e inflamação exagerada (González, 2009)

Embora a doença de Crohn e a colite ulcerativa sejam clinicamente semelhantes, é possível observar padrões de resposta imune bastante distintos. Em geral, a colite ulcerativa é caracterizada por resposta imune Th2, com presença de IL-4, IL-5 e IL-13. Já os pacientes com doença de Crohn apresentam resposta Th1, com produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , e, recentemente, descobriu-se a presença de resposta Th17, com produção das citocinas IL-17 e IL-23 na mucosa inflamada (Fujino, Andoh et al., 2003, Iwakura e Ishigame, 2006).

A IL-17 é produzida preferencialmente por linfócitos T ativados e estimula fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzirem múltiplos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- α , ativação da NOS2, metaloproteinases e quimiocinas, resultando na indução de inflamação (Nakae, Komiyama et al., 2002, Nakae, Nambu et al., 2003, Koenders, Lubberts et al., 2005). Em humanos foram descritos 6 membros da família da IL-17 (A, B, C, D ou IL-27, E ou IL-25 e F). Além de IL-17, as células Th17 são caracterizadas pela produção IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-26 (Bettelli, Carrier et al., Mangan, Harrington et al. 2006) e expressão do fator de transcrição nuclear ROR γ t (Ivanov, McKenzie et al., 2006). O receptor de IL-17, solúvel ou de membrana, é expresso em vários órgãos e tecidos. A IL-23, produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos ativados, é também crucial para o desenvolvimento de doenças autoimunes (Cua, Sherlock et al, 2003, Murphy, Langrish et al., 2003, Touil, Fitzgerald et al., 2006) por favorecer a manutenção da subpopulação de células T CD4⁺ caracterizada pela produção de IL-17, IL-17F, IL-6 e TNF- α , mas não IFN- γ ou IL-4 (Langrish, Chen et al., 2005). Logo, IL-23 está envolvida com a expansão e manutenção das células Th17. Diversas citocinas têm sido descritas na modulação da resposta Th17, ora inibindo (IL-25 e IL-27) ora potencializando (IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β) a liberação de IL-17, porém a participação destes mediadores ainda não está totalmente esclarecida (Pflanz, Timans et al., 2002, Kolls e Linden, 2004, Fallon, Ballantyne et al., 2006, Nurieva, Yang et al., 2007, Zhou, Ivanov et al., 2007). A IL-25 (IL-17E) tem sido implicada em respostas Th2, levando à expressão de IL-4, IL-5 e IL-13, sendo inibidora da resposta Th17 (Fort, Cheung et al., 2001) pelo bloqueio da produção

das citocinas IL-23, IL-1 β e IL-6 (Hurst, Muchamuel et al., 2002, Kleinschek, Owyang et al., 2007). Esta citocina é produzida principalmente por linfócitos T ativados, mastócitos e macrófagos (Ikeda, Nakajima et al., 2003, Kang, Jang et al., 2005). A expressão de IL-25 é crítica para imunidade contra infecções helmínticas e controla a resposta inflamatória crônica promovida por IL-17 (Kolls e Linden 2004, Fallon, Ballantyne et al., 2006). A IL-27 (IL-17D) é uma citocina da família da IL-12 (Pflanz, Timans et al., 2002), e também bloqueia a resposta Th17, porém de forma contrária à IL-25, induzindo resposta Th1 (Owaki, Asakawa et al., 2005). A maior fonte de IL-27 são as células apresentadoras de antígeno, incluindo macrófagos (Pirhonen, Siren et al., 2007). Atualmente, foi descrita também a participação de IL-21 no mecanismo modulador da resposta Th17 (Nurieva, Yang et al., 2007, Zhou, Ivanov et al., 2007). IL-21 é produzida, sobretudo, por células T CD4⁺, principalmente Th2 em relação a Th1 (Wurster, Rodgers et al. 2002). Células T isoladas de camundongos IL-6^{-/-} não são capazes de produzir IL-21 e IL-17, indicando que IL-6 é necessária para a produção de IL-21. Ao que parece, IL-6 atua indiretamente na diferenciação de linfócitos Th17 por meio da produção de IL-21 que, na presença de TGF- β , induz a diferenciação de células Th17 com expressão do receptor de IL-23. Ainda, foram descritas a diferenciação e a produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺ *naive* na ausência de IL-6 e na presença de IL-21, TGF- β e IL-23 (Nurieva, Yang et al., 2007, Zhou, Ivanov et al., 2007). Porém, IL-6 atua sinergicamente com IL-21 e TGF- β na produção de IL-17 por meio de regulação negativa de citocinas inflamatórias que inibiriam a diferenciação de células Th17 e produção de IL-17. O mecanismo de diferenciação de linfócitos Th17 parece ser distintamente regulado em modelo murino e em humanos. Em humanos, foi descrita a participação de IL-1 β e IL-6 na diferenciação de linfócitos Th17, sendo que apenas a presença de IL-1 β já é suficiente para a diferenciação de linfócitos T *naive* para o perfil Th17 (Acosta-Rodriguez, Napolitani et al., 2007).

Nos últimos 10 anos vários grupos detectaram IL-17 em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, como esclerose múltipla, asma, artrite reumatóide e DII, o que sugere sua participação na indução ou desenvolvimento de tais doenças (Nakae, Komiyama et al., 2002, Fujino, Andoh et al., 2003, Nakae, Nambu et al., 2003). Um outro aspecto importante que emerge a partir da descoberta das células Th17, além de seu estreito envolvimento com o desenvolvimento de uma série de

doenças, inclusive inflamatórias intestinais, é sua relação com células T reguladoras (Tregs) CD4⁺CD25⁺, visto que estas podem se diferenciar ou induzir a diferenciação de células Th17, por meio da produção de TGF- β (Xu, Kitani et al., 2007).

As subpopulações de células T com propriedades reguladoras apresentam papel crítico no controle de respostas autoimunes e/ou exageradas. Dentre os diversos subtipos de células com funções supressoras ou reguladoras, uma pequena população de células T CD4⁺ (~10%), que co-expressam constitutivamente a cadeia α (CD25) do receptor de IL-2 (IL-2R) foi inicialmente descrita em 1970 como fundamental para a supressão de respostas autoimunes (Gershon e Kondo, 1970, Suri-Payer, Amar et al., 1998, Takahashi, Kuniyasu et al., 1998, Ng, Duggan, et al., 2001, Jonuleit e Schmitt, 2003). As células CD4⁺CD25⁺, derivadas do timo, foram inicialmente reconhecidas pela sua habilidade em inibir a proliferação de células autorreativas (Suri-Payer, Amar et al., 1998, Takahashi, Kuniyasu et al., 1998, Dieckmann, Plottner et al., 2001, Jonuleit, Schmitt et al., 2001, Singh, Read et al., 2001, McGuirk e Mills 2002, Fontenot e Rudensky, 2004, Mittrucker e Kaufmann, 2004). Além disso, diversos estudos têm demonstrado o papel das Tregs CD4⁺CD25⁺ na supressão e regulação da resposta imune em condições de inflamação e infecção, prevenindo ou atenuando efeitos deletérios de respostas exageradas, como dano tecidual ou até mesmo a morte. De fato, na ausência de Tregs CD4⁺CD25⁺, se verifica o desenvolvimento de doenças autoimunes, bem como se acentua a resposta a aloantígenos e tumores (Singh, Read et al., 2001; Curotto de Lafaille e Lafaille, 2002, McGuirk e Mills, 2002, Baecher-Allan, Viglietta et al., 2004). Além da expressão constitutiva de CD25, tais células são caracterizadas por apresentarem o seguinte fenótipo: CD5^{high}, GITR⁺, CD38⁺ e CD45Rb^{low} (Curotto de Lafaille e Lafaille, 2002, Baecher-Allan, Viglietta et al., 2004, Fontenot e Rudensky, 2004). A expressão do fator de transcrição Foxp3 é característica das Tregs CD4⁺CD25⁺, sendo indispensável para seu desenvolvimento (Chen, Jin et al., 2003, Hori, Nomura et al., 2003). Uma vez ativadas, sua função supressora é antígeno inespecífica, levando à supressão da proliferação de outras células T, ou ainda bloqueando ou diminuindo a produção de mediadores inflamatórios por tais células (Curotto de Lafaille e Lafaille, 2002, Baecher-Allan, Viglietta et al., 2004, Ehrenstein, Evans et al., 2004, Sakaguchi 2004). Embora haja controvérsia quanto a seus mecanismos de ação, acredita-se que possa exercer suas funções de maneira dependente do contato célula-célula

através da molécula inibidora CTLA-4, ou através da produção de citocinas, como TGF- β e IL-10 (Curotto de Lafaille e Lafaille, 2002, Baecher-Allan, Viglietta et al., 2004, Fontenot e Rudensky, 2004, Sakaguchi, 2004). Tais características colocam as células T CD4⁺CD25⁺ como potenciais reguladoras da resposta imune/inflamatória nas DII. De fato, estudos mostram que a regulação do desenvolvimento da inflamação intestinal é dependente da presença e função de células T reguladoras no intestino, que podem agir inibindo respostas inflamatórias excessivas, como Th1 e, supostamente, Th17 (Yu, Saruta et al., 2007, Ishimaru, Yamada et al., 2008). Neste contexto, é provável que o balanço entre a produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-17 e a modulação desta resposta por mecanismos reguladores determine a progressão ou controle da doença.

1.4 TRATAMENTO DA DII

Atualmente, o tratamento da DII é focado, principalmente, na redução do processo inflamatório durante as recidivas, além de prolongar o período no qual o paciente apresenta-se em remissão dos sintomas clínicos. A farmacoterapia de longa duração é a base dos tratamentos, enquanto as cirurgias são indicadas para os casos refratários ou com complicações específicas (Lim e Hanauer, 2004). Embora as terapias atuais sejam direcionadas a vários elementos da cascata imunoinflamatória; nenhuma droga é, no momento, curativa, e uma porcentagem significativa de pacientes requer repetidas cirurgias para combater as complicações da doença (Kozuch e Hanauer, 2008). Além disso, um grupo relevante de pacientes é refratário ou intolerante a várias intervenções farmacológicas. Sendo assim, torna-se evidente que novas terapias ainda são necessárias para o controle da progressão das DII.

O transplante de células tronco hematopoéticas tem se tornado, nos últimos tempos, uma alternativa terapêutica para pacientes com doenças autoimunes graves e refratárias aos tratamentos convencionais (VOLTARELLI, COURI et al., 2007). Nos últimos anos, ensaios clínicos demonstraram que a imunossupressão em altas doses seguida de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TACTH) é capaz de suprimir a atividade inflamatória em pacientes com doenças autoimunes e induzir remissões clínicas prolongadas, embora o mecanismo de ação

ainda não seja bem esclarecido. O racional do TACTH em doenças autoimunes baseia-se na idéia de que a imunossupressão intensa possa eliminar as células autorreativas e que o novo sistema imune reconstituído dos precursores hematopoéticos possa restabelecer a tolerância imunológica. No Brasil, os TACTH em doenças autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, esclerose múltipla e diabetes melito do tipo 1 recém-diagnosticado) iniciaram-se no Hospital das Clínicas da FMRP-USP em 2001. O TACTH para o diabetes melito do tipo 1 é inédito no mundo e tem-se revelado extremamente promissor (Couri, Foss et al., 2006, Voltarelli, Couri et al., 2007). Nos últimos anos, o grupo coordenado pelo Dr. Júlio Voltarelli (FMRP/USP) tem estudado os mecanismos de ação do TACTH no tratamento de diabetes melito do tipo 1 e esclerose múltipla em pacientes com estas doenças autoimunes. Em adição, outros grupos demonstraram que pacientes que passam por TACTH também apresentam remissão de DII (Brittan, Alison et al., 2007), sendo de extrema relevância a validação destes ensaios clínicos com modelos experimentais de doenças autoimunes/inflamatórias. Neste sentido, Godoi e colaboradores, recentemente, estudaram o papel do TACTH em modelo experimental de DII (Godoi et al., 2010). Neste trabalho, a terapia com ciclofosfamida associada ao TACTH foi capaz de induzir a remissão dos sinais clínicos e das alterações histopatológicas associados à DII, com diminuição do infiltrado inflamatório e das respostas Th1 e Th17 na mucosa, além de aumentar a sobrevivência dos animais doentes submetidos apenas ao protocolo de imunossupressão, na ausência do transplante. No entanto, observou-se que o efeito terapêutico do TACTH foi devido, principalmente, ao condicionamento de imunossupressão utilizado previamente aos transplantes, e não necessariamente à infusão das células-tronco hematopoéticas, importantes na manutenção da sobrevivência dos animais. Sendo assim, tornou-se evidente que outras terapias, que resultassem na modulação da resposta imune intestinal sem interferir na sobrevivência dos indivíduos/animais doentes seria de maior relevância para o estabelecimento de novos protocolos terapêuticos para a doença de Crohn e/ou colite ulcerativa.

Neste contexto, em relação ao tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias, acredita-se que **células estromais mesenquimais multipotentes** possam ser aplicadas terapêuticamente na indução de tolerância em pacientes com essas doenças. As células mesenquimais estromais (MSC, *mesenchymal stromal*

cell ou *stem cell*) são células multipotentes que residem principalmente no estroma da medula óssea (1 em 10^4 - 10^5 células mononucleares da medula), mas encontram-se também em vários outros tecidos, tais como músculo, vasos, derme, tecido adiposo, pulmão, fígado, pâncreas e cordão umbilical. Devido a dificuldades na obtenção de MSCs a partir da doação de medula óssea por voluntários, as MSCs humanas obtidas de tecido adiposo subcutâneo tem surgido, ultimamente, como uma alternativa atraente para a terapia celular (Yanez, 2009).

1.5 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES

O isolamento das MSCs da população de células mononucleares da medula assim como de tecido adiposo depende de sua capacidade de aderência ao plástico após 3-7 dias de cultura primária (Le Blanc e Pittenger, 2005). As MSCs têm capacidade de diferenciar-se em vários tipos celulares da linhagem mesodérmica (como osteócitos, adipócitos, condrócitos e células estromais). Elas caracterizam-se pela ausência de expressão de marcadores de linhagens hematopoéticas (tais como CD34, CD45, CD14, glicoforina A e marcadores de células T e B), e pela expressão de vários marcadores celulares (CD44, CD29, CD51/61, CD13, CD54, CD90, CD49e, CD73, CD105, STRO e KDR) e algumas moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, e LFA-3) envolvidas na interação com células T. Elas expressam MHC de classe I e não expressam MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86. Portanto, apresentam um fenótipo não imunogênico ou hip imunogênico. Além disso, foi demonstrado que as MSCs não induzem respostas proliferativas de linfócitos alorreativos (Le Blanc e Pittenger, 2005). Estudos recentes demonstraram que MSCs apresentam uma enorme capacidade imunossupressora e imunoreguladora (Rasmusson, 2006, Uccelli, Moretta et al., 2006). Elas são capazes de suprimir reações mistas de linfócitos, envolvendo células T autólogas ou alogênicas (Di Nicola, Carlo-Stella et al., 2002). Os efeitos imunomoduladores mediados pelas MSCs sobre as células T envolvem diversas interações celulares e moléculas de superfície celular que desempenham esse papel modulador (González, 2009). MSCs inibem a proliferação de células T pela regulação negativa da expressão de ciclina D2 (Glennie, Soeiro et al., 2005), e a inibição da proliferação deve-se à ativação da via de sinalização por PD-1 (Augello, Tasso et al., 2005), um

co-receptor inibidor cuja expressão é induzida em linfócitos T e B, após a ativação celular. Além de atuarem sobre linfócitos T, as MSCs exercem uma regulação geral sobre as respostas imunes, atuando também sobre outras células do sistema imune inato e adaptativo (Aggarwal e Pittenger, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a interação de MSCs humanas com cultura mista de linfócitos inibe a diferenciação de células dendríticas mielóides e favorece a diferenciação de subpopulações de células TCD4⁺ que expressam um fenótipo regulador/supressor CD4⁺CD25⁺. Trabalhos recentes que também avaliaram o papel da infusão das MSCs de tecido adiposo na DII mostrou que estas conseguiram reduzir fortemente a inflamação aguda da mucosa e que este papel protetor pode estar associado à indução de respostas reguladoras (González, González-Rey, 2009).

Além da modulação de respostas imunes, outra propriedade interessante das MSCs consiste em sua capacidade de migração para áreas de lesão tecidual, após administração intravenosa. Esta extraordinária capacidade das MSCs foi demonstrada em casos de fratura óssea, infarto do miocárdio, lesão cerebral isquêmica, dentre outros (Le Blanc e Pittenger 2005). O *homing* preferencial das MSCs de tecido adiposo para tecidos inflamados pode estar correlacionado com a expressão de um conjunto específico de receptores de quimiocinas funcionalmente ativos (CCR1, CCR5 e CCR9) e um painel de integrinas e selectinas, que são envolvidos na migração de leucócitos para tecidos inflamados (González, 2009). Embora com pequenas diferenças, um perfil similar de expressão dos receptores de quimiocinas e moléculas de adesão tem sido descrita em MSCs de medula óssea (Chamberlain, 2007). Ao que parece, as MSCs necessitam de contato célula-célula e fatores solúveis para desativação de macrófagos e células T. PGE₂ e IL-10 parecem desempenhar um papel crítico neste efeito inibidor. Curiosamente, MSCs podem produzir principalmente IL-10 após o contato celular com macrófagos, e esse contato também ativa macrófagos a produzir grandes quantidades de IL-10. Embora o envolvimento de PGE₂ e IL-10 na ação imunossupressora da MSCs de medula óssea tenha sido amplamente demonstrado por outros pesquisadores (Glennie, Jian, Barry, 2005, Cui, Sato, 2007), outros trabalhos também mostraram que além de seu potente efeito antiinflamatório, o tratamento com as MSCs diminui a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , sendo que a inibição das respostas Th1 pode ser o resultado de uma ação direta sobre as células T efetoras (González, 2009). Um trabalho recente obteve resultados controversos, propondo que IFN- γ , quimiocinas e

óxido nítrico são necessários para as MSCs de medula óssea exercerem a função de imunossupressoras (Ren, 2008).

Com base em suas propriedades imunológicas, principalmente sua capacidade imunossupressora, acredita-se que as MSCs possam ser aplicadas terapêuticamente na indução de tolerância em transplantes e no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias humanas. Além do potencial imunossupressor e imunomodulador, pode também ser explorado no mesmo conjunto de doenças, o potencial de diferenciação celular e regeneração tecidual das MSCs, visando à reconstrução dos tecidos lesados. Atualmente, alguns ensaios clínicos estão se iniciando na Europa utilizando essas células para tratar doenças reumáticas e neurológicas de natureza autoimune. No Brasil, foram iniciados recentemente no Hospital das Clínicas da FMRP-USP protocolos experimentais de infusão de MSC em pacientes com diabetes melito do tipo 1 recém-diagnosticados ou com *doença do enxerto versus hospedeiro* (GVHD) aguda e crônica. O objetivo desses protocolos clínicos é a avaliação da segurança da infusão de MSC e da eficácia das MSC sobre a lesão autoimune.

Além de ensaios em humanos, vários estudos pré-clínicos em modelos animais têm demonstrado o potencial terapêutico da infusão de MSC no tratamento de doenças autoimunes (El-Badri, Maheshwari et al., 2004). Em um desses trabalhos, camundongos portadores de EAE foram submetidos à infusão de MSCs autólogas transfectadas com proteína fluorescente verde (GFP) em diferentes fases do desenvolvimento da doença neurológica (Zappia, Casazza et al., 2005). Observou-se que quando as células eram infundidas antes ou durante a instalação da doença, havia diminuição da incapacidade neurológica e redução dos achados anátomo-patológicos de inflamação e desmielinização no sistema nervoso central dos animais. Entretanto, não se observou efeito terapêutico no grupo que recebeu as células após a instalação das manifestações neurológicas. Nesse mesmo estudo, detectou-se a presença de células marcadas por GFP nos órgãos linfóides dos animais, sugerindo uma participação direta dessas células sobre a resposta autoimune, possivelmente bloqueando a agressão mediada por linfócitos T. Em estudo semelhante, MSCs obtidas da medula óssea humana, injetadas em camundongos com EAE, sem imunossupressão prévia, produziram significativa melhora clínica nos animais, reduzindo a inflamação e contribuindo para a regeneração de oligodendrócitos no sistema nervoso central (Zhang, Li et al., 2005).

O efeito das MSCs sobre camundongos MLR/lpr, que desenvolvem espontaneamente uma doença muito semelhante ao lúpus, com nefrite fatal na maioria dos animais, também foi avaliado (Ishida, Inaba et al., 1994). Outro estudo, ao contrário dos demais, falhou em demonstrar melhora clínica ou histológica em camundongos portadores de artrite induzida submetidos à infusão de MSCs (Hess, Li et al., 2003, Djouad, Fritz et al., 2005). Por outro lado, células humanas estromais multipotentes da medula óssea migram e promovem reparo das ilhotas pancreáticas e glomérulos renais de camundongos NOD/Scid diabéticos (Lee, Seo et al., 2006). Neste sentido, o grupo coordenado pelo Dr. Júlio Voltarelli vem desenvolvendo, também, além de ensaios clínicos, estudos em modelos animais nos quais se avalia o potencial terapêutico de MSC humanas no tratamento de diabetes experimental e em feridas cutâneas induzidas por queimaduras. Considerando-se MSC e DII, sabe-se que a deposição exacerbada de matriz extracelular na mucosa é associada à presença de MSC expressando receptores de TGF- β em modelo murino de colite (Whiting, Tarlton et al., 2003). Além disso, estudo recente demonstrou que as MSC, quando implantadas diretamente no cólon de ratos com DII experimentalmente induzida, estavam associadas à cicatrização acelerada da colite induzida por TNBS. Estes efeitos benéficos das MSC podem ter sido mediados, pelo menos em parte, por sua capacidade de se diferenciar em células intersticiais do cólon ou de induzir VEGF e TGF- β na área lesionada (Hayashi, Tsuji et al., 2008). Vale ressaltar que a colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em modelo experimental possibilita o estudo da fisiopatologia da doença inflamatória do cólon e de novos tratamentos. A resposta inflamatória no modelo TNBS inclui infiltração da mucosa e submucosa por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos, mastócitos do tecido conjuntivo, e fibroblastos. Podem ser observados também granulomas e células gigantes do tipo Langerhan's (Morris et al., 1989), e, principalmente, produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-12 (Neilly et al., 1995, Hollenbach, 2005, Te Veld, 2006), além de IL-23 e IL-17 (Fichtner-Feigl, 2005). Neste caso, a colite induzida por TNBS é considerada semelhante à doença de Crohn no humano (Selve e Wöhrmann, 1992), apresentando um padrão de resposta Th1/Th17 pela produção de suas respectivas citocinas (Fujino, Andoh et al., 2003, Iwakura e Ishigame, 2006).

1.6 HIPÓTESE e JUSTIFICATIVA

As (DII) afetam milhares de pessoas em todo o mundo, causando dor abdominal, diarreia, sangramento retal, perda de peso, febre e fadiga, além de obstrução intestinal e fístulas. Ainda, a inflamação severa pode ocasionar danos prolongados e ocasionalmente irreversíveis da função e estrutura gastrintestinal além de desencadear o desenvolvimento de outras doenças como câncer cólon-retal. Entretanto, no momento, nenhum tratamento é totalmente efetivo, nenhuma droga é curativa, e uma porcentagem significativa de pacientes requer repetidas cirurgias para combater as complicações da doença. Além disso, um grupo relevante de pacientes é refratário ou intolerante a várias intervenções farmacológicas, tornando-se evidente a necessidade de novas terapias para o controle da progressão das DII. Neste contexto, sendo as adMSCs uma fonte de células tronco ideal para terapias celulares em virtude de seu fácil isolamento, expansão e capacidade imunomoduladora, nossa hipótese é a de que as adMSCs possuem efeito terapêutico na DII. Sendo este estudo pré-clínico, visamos validar futuros ensaios clínicos já utilizando MSC de humanos. Além disso, como nenhum dos trabalhos anteriores avaliou, em detalhes, a modulação da resposta imune inflamatória, em especial Th17, após terapia com MSC, tornam-se necessários estudos mais aprofundados sobre o potencial terapêutico dessas células nas DII.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o potencial terapêutico das células mesenquimais estromais na doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Isolar MSC de tecido adiposo (AdMSC) de indivíduos saudáveis e realizar sua caracterização fenotípica e funcional

2.2.2 Avaliar, por análise clínica e histopatológica, o desenvolvimento da inflamação intestinal camundongos com colite induzida experimentalmente, tratados ou não com AdMSC.

2.2.3 Caracterizar, as células do infiltrado inflamatório envolvidas no desenvolvimento da colite, tratada ou não com AdMSC

2.2.4 Estudar a modulação da resposta imune intestinal por meio da produção de citocinas em animais com colite tratados ou não com MSC, com ênfase nas subpopulações de células T reguladoras e Th17.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, entre 6 e 8 semanas de idade, criados e mantidos no biotério da disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Os animais foram mantidos com 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 (TNBS) e grupo 4 camundongos com colite tratados com infusão de MSC. Todos procedimentos de experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFTM. (Processo CEUA No.106/2008 – ANEXO 1)

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

O protocolo padrão de indução de colite está bem estabelecido na literatura científica e já foi padronizado e utilizado em trabalho anterior do grupo (Morris, 1989, Godoi et al., 2010). Brevemente, os camundongos foram deixados em jejum por 12h, mantidos com uma 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 (para quebrar a barreira intestinal), em solução de pH 7.4. Para a realização deste enema, uma seringa de 1 ml contendo a solução de TNBS foi acoplada a um cateter de 3,5F, cuja ponta foi mergulhada em vaselina e cuidadosamente inserida no colón dos animais até cerca de 4 cm distal ao ânus. Após a injeção, os animais foram mantidos de cabeça para baixo por 60 segundos. Os camundongos foram pesados diariamente e avaliados

quanto à presença dos sinais clínicos da doença (como por exemplo, diarreia, sangramentos).

3.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO (adMSCs)

Amostras de tecido adiposo de doadores saudáveis submetidos a procedimentos de cirurgia plástica (abdominoplastia ou lipoaspiração) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, foram colhidas sob consentimento informado (ANEXO 2), de acordo com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFTM (Processo CEP No.1447/2009 – ANEXO 3). Em seguida, o tecido adiposo foi imerso em PBS1x acrescido de Antibiótico (Penicilina G sólida: 0,01UI/mL, Sulfato de estreptomicina: 0,01µg/mL) e anti-fúngico (Anfotericina B 25µg/mL) por no mínimo 4 horas, depois incubadas à 37° C em collagenase Tipo I (GIBCO, Grand Island, EUA) a 0,3 mg/mL em solução de PBS para digestão do tecido e liberação das células. As células presentes foram cuidadosamente coletadas, lavadas duas vezes com RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, EUA) contendo 10% soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, EUA) centrifugadas a 4°C, 10 min, 677 x g e contadas com corante Azul de Tripán a 0,2% em câmara de Neubauer.

3.4 CULTURA DAS adMSCS

Após a separação das células do tecido adiposo, 1×10^6 células foram suspensas em meio de cultura DMEM (GIBCO BRL, Grand Island, EUA) enriquecido com 15% de soro bovino fetal (SBF) (Hyclone Thermo Scientific, South Logan, CA) e antibióticos (0,01µg/mL de Penicilina – Estreptomicina), plaqueadas em garrafa de 75 cm² e cultivadas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24h, as células não-aderentes foram removidas e foram adicionados 20 ml de meio de cultura. O meio foi trocado a cada 3-4 dias e quando as células estavam semi-confluentes, estas foram tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,5% 1x (GIBCO BRL, Grand Island, EUA) por 3 minutos, depois desativada com RPMI enriquecido de SBF 10%. As células foram cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com RPMI 10% de SBF, e

repicadas para a 1ª passagem ($\sim 7,5 \times 10^5$ células por garrafa). Na terceira passagem, foram separadas amostras para caracterização imunofenotípica; caracterização multipotencial: diferenciação em adipócitos/osteócitos e infusão nos camundongos com DII induzida experimentalmente.

3.5 IMUNOFENOTIPAGEM DE adMSCS

Alíquotas de MSC a 1×10^6 células/ml foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro com anticorpos monoclonais ou isotipos controle diretamente conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). Foram feitas marcações simples ou duplas para a análise dos diversos marcadores de MSC. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a $500 \times g$, lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em $200 \mu\text{l}$ de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickson, San Jose, CA). Foram adquiridos 20000 eventos/amostra com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). As análises foram realizadas utilizando-se o software *Cellquest* (BD Becton Dickinson, San Jose, CA). Para a caracterização imunofenotípica das MSCs foram utilizados os anticorpos monoclonais contra os marcadores CD45, CD14 CD 90, CD73, CD31, CD166, CD34, CD13. Para análise, foi desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os eventos da *gate* e células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 1 (FL1, FITC) ou de fluorescência 2 (FL2, PE).

3.6 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS adMSCS

Ao entrarem em confluência na terceira passagem, as adMSCs foram induzidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos. Alíquotas de 1 ml contendo 40.000 células (diferenciação em adipócitos e osteócitos) ou 5.000 células (controle) foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas para a realização de estudos morfológicos. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início do cultivo, quando a aderência e confluência estavam em torno de 50%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e foi adicionado 1 ml de meio de indução

(adipócitos ou osteócitos) ou somente o meio DMEM 15% SFB como controle. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana. O meio utilizado para troca continha o dobro da concentração dos agentes indutores. As células foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ até a diferenciação celular e monitorizadas sob microscopia invertida. Para diferenciação em adipócitos, foi utilizado meio DMEM 15% SBF, suplementado com 10 µM de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), depois as lamínulas do cultivo foram coradas com Sudan II Escalate. Para diferenciação em osteócitos, foi utilizado meio DMEM 7,5% SBF suplementado com 0,10 µM de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Brasil), 100 µM de ácido ascórbico e 10 mM de β glicerolfosfato (Reagem, Brasil). Após cultivo e diferenciação, as lamínulas foram coradas com Alizarin Red.

3.7 ENSAIO DE CO-CULTIVO DAS adMSCs COM LINFÓCITOS

Para analisar o potencial supressor das MSC isoladas do tecido adiposo, a porcentagem de proliferação de linfócitos normais na presença de MSCs foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o método de marcação com CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Quando células marcadas com CFSE se dividem, o CFSE é distribuído igualmente entre as células filhas, as quais passam a apresentar metade da fluorescência (verde) da célula mãe. Desse modo, a perda de fluorescência das células é proporcional à sua proliferação. Para o ensaio, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos normais foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade, ressuspensas a $1-10 \times 10^6$ /ml em PBS/0,1% albumina humana e marcadas com CFSE (5 µM por 10 min). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS/0,1% albumina humana e ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal numa concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL. Em placa de cultura de 24 poços, as PBMCs marcadas com CFSE foram adicionadas aos poços (1 ml/poço) contendo as MSCs em diferentes concentrações (MSCs: PBMCs, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100). Em seguida, as PBMCs foram estimuladas com 5 µg/ml do mitógeno fitohemaglutinina

(PHA), e co-cultivadas com as MSCs por 5 dias a 37°C com 5% CO₂. Foram feitas duplicatas de cada condição, sendo posteriormente calculada a média da porcentagem de proliferação. Foram feitos controles de co-culturas sem PHA e de PBMCs não-marcadas com CFSE. Durante todo o experimento as células foram protegidas da luz para evitar perda de fluorescência de CFSE. Após 5 dias, as PBMCs foram coletadas, marcadas com anticorpo anti-CD3 PE e analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 50.000 eventos na *gate* de células CD3⁺. Para análise, foi feita uma *gate* R1 em linfócitos CD3⁺ e os eventos representados por um histograma.

3.8 INFUSÃO DE adMSCS

As adMSCs foram primeiramente infundidas nos animais, por via intraperitoneal em diferentes concentrações (0,25x10⁶, 1x10⁶, 2x10⁶ adMCSs por animal) para avaliação da dose ideal de tratamento, 24 horas após a indução da colite. Em seguida, foi averiguada a melhor via de infusão, intraperitoneal ou intrarretal (1x10⁶ adMSCs por animal). Para evitar formações de grumos celulares e assegurar uma distribuição uniforme, as MSCs foram ressuspensas em um volume adequado de solução PBS acrescido de 1mg/mL de *Pulmozyme* (ROCHE, South San Francisco, EUA). Assim como após a indução da doença, os camundongos foram também monitorizados diariamente em relação ao peso e presença de sinais clínicos como diarreia, seguido à indução de colite e infusão das MSCs.

3.9 EUTANASIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os camundongos foram eutanasiados nos dias 3, 7, 14 e 60 após a indução da colite, e o intestino, baço e linfonodos mesentéricos foram coletados para as análises posteriores. Também foram eutanasiados animais apenas com colite (TNBS) sem infusão de células (PBS) e controles com veículo do TNBS (Etanol) e sem a doença (FIG. 1). Amostras foram coletadas e imersas em PBS/formaldeído 10% para inclusão em parafina, meio de cultura RPMI completo para posterior extração das células e quantificação por citometria de fluxo ou foram congeladas

diretamente em nitrogênio líquido para trituração e dosagem de citocinas e enzimas nos homogeneizados de tecidos.

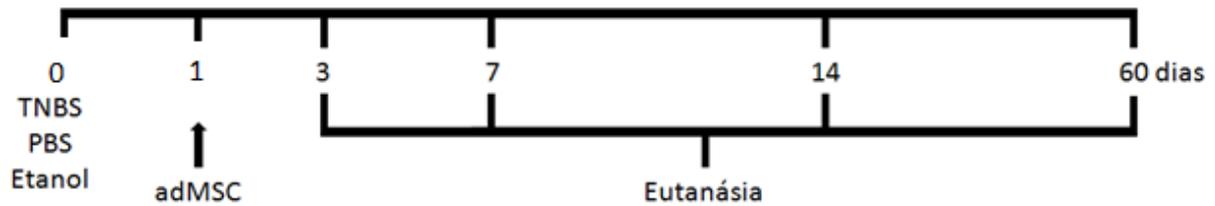


FIGURA 1 - Esquema de eutanásia para a coleta das amostras dos camundongos controles PBS e etanol, com a DII e tratados com as adMSCs.

3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A avaliação histológica foi realizada através da coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de amostras fixadas em formaldeído 10% em PBS. Os tecidos de cólon coletados foram deixados em formaldeído por 24h e depois passados para etanol 70%. As amostras foram incluídas em parafinas e foram realizados cortes de 5µm de espessura no micrótomo. Depois de coradas com H&E as imagens dos cortes histológicos foram capturadas e analisadas por um sistema de análise de imagens, utilizando uma câmera acoplada a microscópio e computador. Para avaliar a segurança do transplante de MSCs, amostras de outros órgãos, como cérebro, coração, pulmões, fígado, músculo, pâncreas, intestino delgado, estômago e rins foram também coletadas, processadas e analisadas conforme descrito acima.

3.11 ESCORE CLÍNICO DA DII

Os animais com colite que receberam ou não o transplante das adMSCs foram avaliados quanto à presença de sinais clínicos da doença, como perda de peso, diarréia, sangramento retal, diarréia sanguinolenta e morte nos 7 primeiros dias pós-indução de DII e tratamento. Para esta avaliação, foi utilizado um critério de pontuação, no qual cada sinal apresentado pelo animal corresponderia a 1 ponto, sendo que a morte do animal significaria pontuação máxima, com a soma de todos os sinais (4 pontos). Por fim, foi realizada a soma de todos os valores de cada animal individualmente, sendo estes dados apresentados graficamente.

3.12 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

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

3.13 ENSAIO EOSINÓFILO-PEROXIDASE (EPO)

Para quantificação de eosinófilos, foi avaliada a atividade da enzima EPO nos tecidos inflamados e controles (Strath et al., 1985). Para tal, os tecidos foram removidos, pesados e ressuspensos em tampão Hanks sem vermelho de fenol, contendo 10 mM de Hepes (Sigma-Aldrich, EUA) e então homogeneizados. O homogenato foi centrifugado a 1950 g por 10 min e o *pellet* lisado por meio de choque hipotônico. Esta suspensão resultante foi novamente centrifugada a 1950 g por 10 min e o *pellet* ressuspensão em tampão Hanks contendo 0,5% de HTAB. Foi realizado choque térmico das amostras seguido por centrifugação, sendo o sobrenadante utilizado para as reações. As amostras foram incubadas, em placas de 96 poços, com OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão Tris/HCl 0,05 mM e H₂O₂ durante 30 minutos à temperatura

ambiente. A reação foi interrompida com H_2SO_4 4M e a absorvância determinada a 492 nm.

3.14 CITOMETRIA DE FLUXO

Para a quantificação e fenotipagem das células do infiltrado inflamatório de camundongos controles (etanol), com a colite ou tratados com infusão de adMSC, foram coletados baço, linfonodos mesentéricos e colón. Após maceração do baço com pinças e linfonodos mesentéricos passados em peneiras estéreis, as células foram coletadas cuidadosamente, lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de SBF e ressuspensas em 2 mL RPMI 1640 completo. O colón foi removido e separado em fragmentos destinados à avaliação da lâmina própria e dos linfócitos intraepiteliais. Para a lâmina própria, o cólon foi cortado em pequenos pedaços, que foram imersos em PBS com 3mM EDTA e colocados no agitador magnético por 20 minutos. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas por 10 minutos em 470 x g a 4°C, foi desprezado o sobrenadante, adicionado RPMI 1640 1% de SBF com 1 mM EDTA e 1,5 mM MgCl_2 e agitado novamente por 30 minutos. Em seguida realizou-se centrifugação 470 x g 10 minutos a 4°C. Os tubos foram passados em vortex por 2 minutos e incubados em liberase 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ROCHE, Mannheim, Germany) diluída em meio RPMI incompleto (sem SBF) por 60 minutos em estufa a 37°C. Após este período foram acrescentados 3 mL de RPMI com SBF para inativar a liberase, seguido por homogeneização e centrifugação. As células foram ressuspensas, passadas em coluna de nylon, centrifugadas novamente, passadas em Ficoll HypaqueTM (d= 1,077, Amersham Biosciences, EUA) e centrifugadas por 25min, a 25°C, 434 x g . As células da interface do Ficoll foram cuidadosamente coletadas e lavadas com RPMI 1640 enriquecido com 10% de SBF. Os linfócitos intraepiteliais foram raspados do tecido do colón com um uma lâmina de bisturi, colocados em RPMI 10% SBF 1mM DTT (ROCHE, Mannheim, Germany) e colocados no agitador magnético por 15 minutos. Após este período foram centrifugados por 10 minutos em 470 x g a 4°C, foi desprezado o sobrenadante e adicionado RPMI 1640 10% SBF, seguido por agitação no vortex por 3 minutos, e centrifugação em Ficoll HypaqueTM, por 25min, a 25°C, 434 x g. As células da interface do Ficoll foram

cuidadosamente coletadas e lavadas com RPMI 1640 10% de SBF. No final do processo todas as amostras foram contadas na câmara de Neubauer e, em seguida, utilizadas nos experimentos de cultura ou imunofenotipagem. Para caracterização fenotípica das células T reguladoras, foi avaliada a expressão dos marcadores CD3, CD4, CD25, GITR, CTLA-4, CD45RB, Foxp3, e PD-1. Além disso, o infiltrado celular nos tecidos coletados foi também analisado para quantificação das células CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, natural killer (NK), NKT e linfócitos T $\gamma\delta$. Os anticorpos usados eram conjugados a um os fluorocromos FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*), Alexa Fluor 488, PE (*Phycoerythrin*) ou PerCy5 (*Phycoerythrin-Cy5*) (BD Pharmigen™, San Diego, USA) conforme Tabela 1.

Para marcação fenotípica, as células mononucleares foram divididas em tubos específicos e incubadas com 100 μ L de PBS 1x molico 1%, por 20 minutos à temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas, seguido pela adição de anticorpos fluorescentes de superfície, com incubação por 30 minutos à 4°C no escuro. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células com PBS e fixação com PBS/formaldeído 1%. Para a marcação dos antígenos intracelulares (FoxP3 e CTLA-4), após a marcação de superfície e lavagem das células foram adicionados 100 μ L da solução Cytofix/Cytoperm (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation Kit with BD GolgiStop™, BD Biosciences, San Diego, EUA) com incubação de 20 minutos à 4°C no escuro, seguida por lavagem com PBS e adição de 100 μ L da solução de permeabilização Perm/Wash (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation Kit with BD GolgiStop™, BD Biosciences, San Diego, EUA), contendo os anticorpos fluorescentes para marcação intracelular. Procedeu-se incubação por 30 minutos à 4°C no escuro, lavando com PBS e centrifugação por 10 minutos a 4°C a 470 x g. Após desprezado o sobrenadante, foi feita adição de PBS/Formaldeído 1% para fixação das amostras.

Para detecção de Th17, a produção de IL-17 foi determinada após cultivo dos leucócitos dos linfonodos mesentéricos, *in vitro*, estimulados com forbol-miristato-acetato (PMA, 50 μ g/mL) e ionomicina (1 μ g/mL). As células foram cultivadas em placas de 96 poços, numa concentração de 5x10⁵ células por poço, no qual foi também adicionado 1 μ L de GolgiStop (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation Kit with BD GolgiStop™, BD Biosciences, San Diego, EUA) para bloquear os processos de transporte intracelular, levando ao acúmulo da maioria das citocinas no complexo de Golgi, resultando em melhor sinal de marcação. As células foram

mantidas em cultura em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 4 horas. Após este período foram coletadas e distribuídas em tubos de citometria para marcação de CD3 e CD4 de superfície e da citocina IL-17 intracelular. As células foram lavadas e incubadas com 100 µL de PBS 1x molico 1%, por 20 minutos à temperatura ambiente (para bloquear ligações inespecíficas) em seguida adicionou-se 1.5 µg de anticorpos monoclonais específicos, por 30 minutos a 4°C. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e centrifugadas a 470 x g por 10 minutos. A marcação da IL-17 foi feita como os marcadores intracelulares, já descritos. Os leucócitos foram adquiridos em FACscalibur (Becton & Dickson[®], San Jose, CA) e as análises foram feitas usando o software “FlowJo 7.6” (Tree Star, Ashland, OR).

Tabela 1 - Tabela 1 - Anticorpos usados para caracterização fenotípica dos leucócitos de baço, linfonodos mesentéricos e intestino

Células não cultivadas			
Tubos	Fluorocromo FITC/Alexa Flúor 488	Fluorocromo PE	Fluorocromo PeCy 5
1 - Isotipo Controle	IgG1	IgG1	IgG1
2 - Linfócitos T CD4 e CD8	CD8	CD3	CD4
3 - Células NK e NKT	CD49b	CD3	
4 - Monócitos e células dendríticas	CD11c	CD11b	
5- Linfócitos γδ	γδ	CD3	
6 - Células T reguladoras	CD25	CD45RB	CD4
7 - Células T reguladoras	CD25	GITR	CD4
8 - Células T reguladoras	CD25	PD-1	CD4
9 - Isotipo Controle permeabilizado	IgG1	IgG1	IgG1
10 - Células T reguladoras	CD25	FoxP3	CD4
11 - Células T reguladoras	CD25	CTLA-4	CD4
Células cultivadas			
12 - Isotipo controle	IgG1	IgG1	IgG1
13 - Células Th17	IL-17	CD3	CD4
14 - Isotipo controle*	IgG1	IgG1	IgG1
15 - Células Th17*	IL-17	CD3	CD4

* Estimuladas com PMA e ionomicina

3.15 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para obtenção dos percentuais das populações celulares marcadas analisou-se em gráficos de pontos (Dot-plot) as propriedades de tamanho e granulosidade (*FSC* e *SSC*) das células, marcando-se *gates* em regiões específicas de linfócitos ou monócitos, das quais foram extraídos os dados de fluorescência. Os resultados foram obtidos subtraindo-se o valor encontrado para as células marcadas com anticorpos do valor encontrado para as células marcadas com os respectivos isotipos controles. Os fluorocromos utilizados para cada anticorpo encontram-se na tabela 1. Para quantificação de linfócitos T, realizou-se uma primeira análise nos parâmetros *SSC* x $CD3^+$, e a população correspondente às células $CD3^+$ de granulosidade compatível com linfócitos foi delineada. Para quantificação das subpopulações de linfócitos T realizou-se também uma primeira análise nos parâmetros *SSC* x *FSC*, seguida por um *dot plot* para população correspondente às células $CD3^+$ x $CD4^+$ ou $CD3^+$ x $CD8^+$, e a região compatível com linfócitos duplo positivos foi delineada. Para verificação das populações de NK e NKT, as análises foram feitas nos parâmetros *SSC* x $CD3^+$ e marcadas as regiões correspondentes a células $CD3^+$ ou $CD3^-$. A partir destas foram obtidos histogramas para $CD49b^+$ dentro das regiões positivas ou negativas para *CD3*. Já para as populações de monócitos e células dendríticas, analisamos nos parâmetros *SSC* x $CD11b^+$ ou $CD11c^+$, e depois foi realizado o histograma desta mesma marcação. Para o duplo positivo, sobrepomos a marcação de $CD11b^+$ sobre o histograma de $CD11c^+$ e vice-versa. Já na marcação de linfócitos T $\gamma\delta^+$, as análises foram feitas nos parâmetros *SSC* x $CD3^+$, marcando a região correspondente aos linfócitos e fazendo um histograma para $\gamma\delta^+$. Para obtenção dos percentuais das células T reguladoras a primeira *gate* foi delineada inicialmente na região de linfócitos em *FSC* x *SSC*, seguida por *gate* nas regiões duplamente positivas para os anticorpos anti-*CD4* e anti-*CD25*. Em seguida, foram obtidos histogramas para verificação das marcações para FoxP3, CTLA-4, $CD45RB^{low}$, GITR e PD-1. O mesmo foi realizado para as populações $CD4^+CD25^-$. Para obtenção dos percentuais de células $CD4^+$ produtoras de IL-17, foi realizado o delineamento de $CD3^+$, nos gráficos de *SSC* x *CD3* seguido de dot plot e *gate* na região duplo positiva para $CD4^+$ e IL17.

3.16 HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Para quantificação das citocinas, foram coletadas amostras do colón de camundongos controles que receberam etanol, com a colite e de animais com colite tratados com as adMSCs. Para tal, os tecidos foram removidos, pesados e ressuspensos em tampão com inibidor de protease (Complete, Roche) e então homogeneizados. Os homogenatos foram centrifugados a 1950 x g por 15 min e o sobrenadante utilizado para as reações. No ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, BD Pharmigen™, San Diego, USA) utilizamos placas com 96 poços, onde 50µl da amostra foram incubados com os anticorpos de captura e de detecção para IL-4 ou IL-5, de acordo com as recomendações do fabricante (BD Pharmigen™, San Diego, EUA). 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. A presença das citocinas IL-2, TNF-α e IL-6 nos homogenatos foi analisada por CBA (*Cytometric Bead Array* BD Pharmigen™, San Diego, EUA). As amostras foram distribuídas em tudos de citometrias com *beads* contendo os anticorpos de captura. Em seguida às incubações com estas *beads* e reagentes de detecção, procedeu-se à centrifugação e lavagem. As amostras foram então ressuspensas em PBS 1x e adquiridas em FACscalibur (Becton & Dickson®, San Jose, CA).

3.17 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 paramétricos t não pareados ou ANOVA – *One way* seguido de comparação múltipla de Tukey e os resultados foram expressos em média (média e desvio padrão). 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 – Log Rank. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterizações das MSCs

Como critérios de padronização e definição das adMSCs (quanto às características fenotípicas, funcionais e diferenciação) foi realizada primeiramente uma avaliação das culturas das células obtidas de amostras de tecido adiposo de indivíduos saudáveis. Após 3^a passagem consecutiva, as células aderentes foram tripsinizadas e quantificadas para imunofenotipagem. A caracterização das células provenientes desta cultura mostrou expressão de marcadores como CD90, CD73 e CD13 com expressão intermediária de CD166 e baixa expressão de CD45, CD14, CD31, CD34 (FIG.2), sugerindo tratar-se de fato, de células mesenquimais estromais, como descrito na literatura (Meirelles et al.,2003, Dominici et al., 2006).

Sabe-se que as MSCs de medula óssea e tecido adiposo apresentam capacidade de diferenciação em três linhagens mesodérmicas (adipócitos, osteócitos e condrócitos). Neste estudo, avaliamos a capacidade de diferenciação de MSCs isoladas de tecido adiposo em duas linhagens mesodérmicas (adipócitos e osteócitos) (FIG.3).

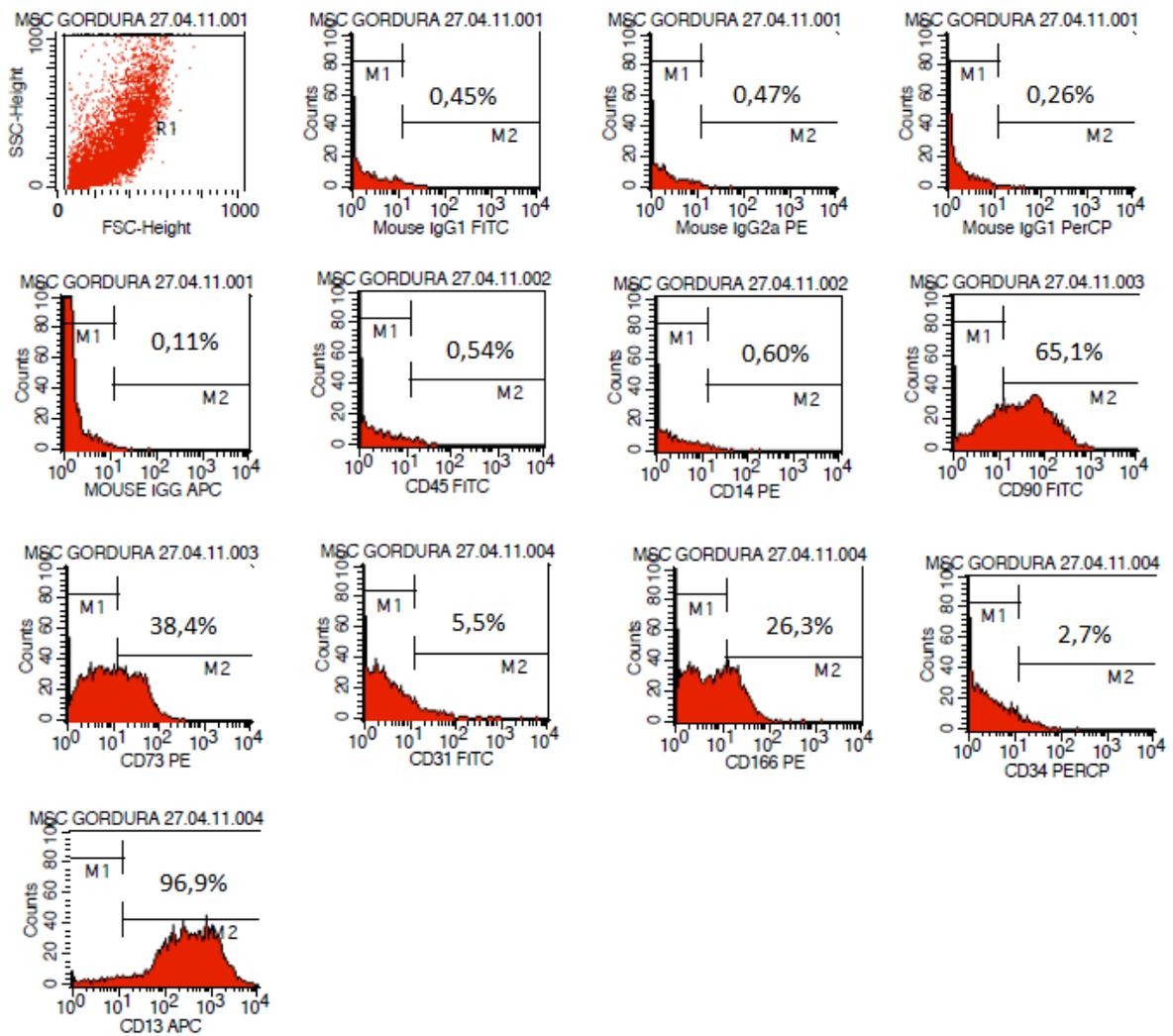


FIGURA 2 - Caracterização imunofenotípica de células mesenquimais estromais (MSC) isoladas de tecido adiposo de indivíduo saudável. As MSCs foram isoladas a partir da digestão enzimática de tecido adiposo de indivíduo saudável, separadas por centrifugação em gradiente de densidade e cultivadas em meio de cultura DMEM com 15% de soro bovino fetal. Na terceira passagem, as células foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos contra diversos antígenos de superfície expressos ou não nas MSCs (CD45, CD14, CD90, CD73, CD31, CD166, CD34, CD13). Para análise, foi desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os eventos da *gate* de células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 1 (FL1, FITC - isotiocianato de fluoresceína) ou fluorescência 2 (FL2, PE - ficoeritrina). Os valores em M2 representam a porcentagem de células positivas para aquele determinado antígeno de superfície e M1 a porcentagem de células negativas.

Ao cultivarmos as células obtidas em meio de indução de diferenciação osteogênica por 18 dias, as mesmas diferenciaram-se em osteoblastos, formando depósitos de compostos de cálcio os quais foram corados por Alizarin Red (FIG.3B). A coloração Sudan II-Escarlate revelou a presença de depósitos lipídicos (corados em alaranjado) no citoplasma daquelas cultivadas em meio de indução de diferenciação adipocítica por 21 dias, indicando sua diferenciação em adipócitos *in*

vitro (FIG.3D). As células não cultivadas em meio de indução de diferenciação adipocítica ou osteoblástica não se diferenciaram em adipócitos ou osteoblastos, respectivamente (FIG.3A, C). Tais resultados nos permitiram supor que, de fato, a maioria das células obtidas após cultura apresentava fenótipo de MSC; confirmando a plasticidade e multipotencialidade das mesmas, *in vitro*.

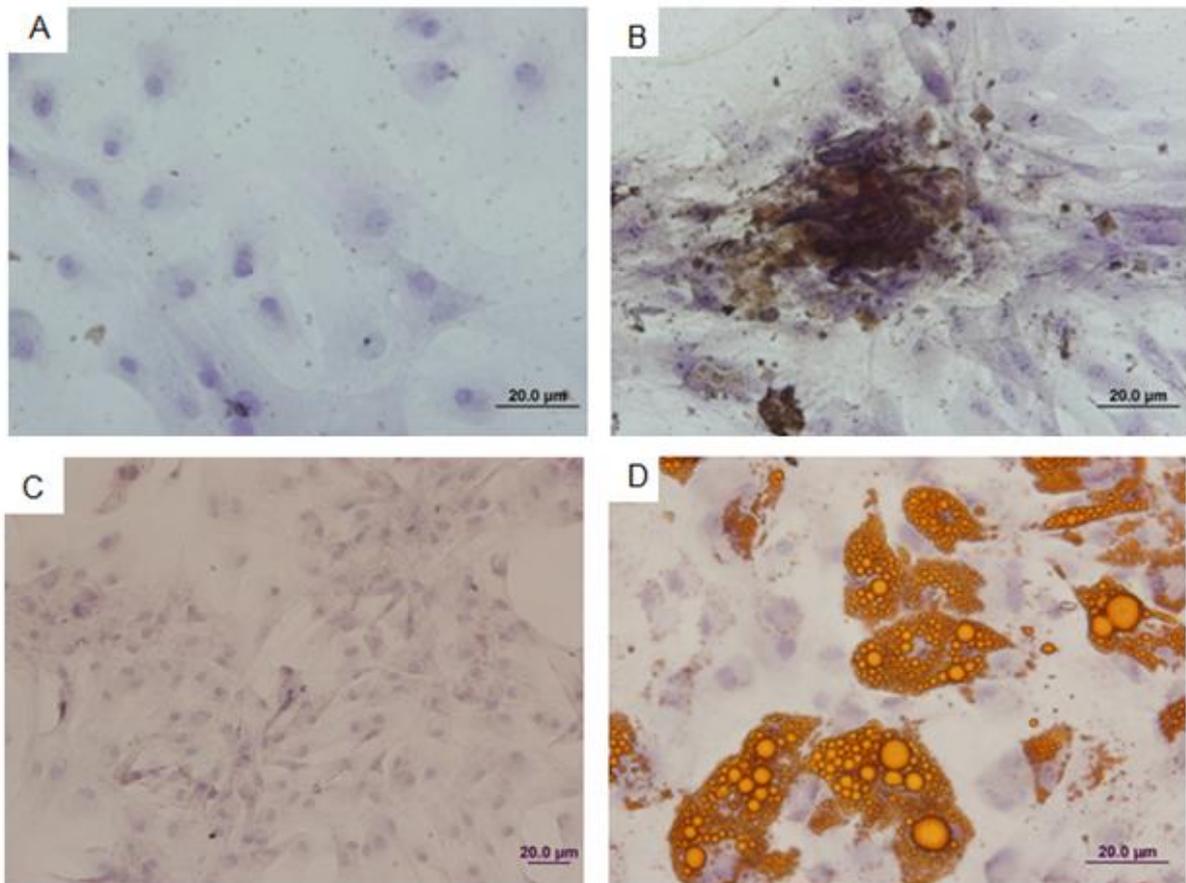


FIGURA 3 - Fotomicrografias da diferenciação de MSC em osteoblastos e adipócitos *in vitro*, em terceira passagem (B e D). As adMSCs após cultivo por 18 dias em meio indutor de diferenciação osteogênica. A coloração Alizarin Red evidenciou a presença de depósitos de cálcio (regiões marrons) indicando a diferenciação osteoblástica (B). Após cultivo por 21 dias em meio indutor de diferenciação adipogênica. A coloração de Sudan II-Escarlate evidenciou a presença de depósitos lipídicos proeminentes no citoplasma das células, indicando a diferenciação das adMSCs em adipócitos (D). As adMSCs não cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica ou osteogênica e submetidas às mesmas colorações, não apresentando evidências de diferenciação osteogênica ou adipogênica (A e C).

Com o intuito de comprovarmos o potencial supressor das MSCs de tecido adiposo, foi realizado um ensaio de co-cultura junto com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos normais, estimuladas com PHA na presença de números crescentes de adMSCs. Os resultados demonstraram inibição da proliferação de PBMCs estimuladas com

PHA na presença de adMSCs. Quando as MSC foram cultivadas com PBMCs na proporção de 1:2 (MSC:PBMC) observou-se que apenas 16,11% das células proliferaram (FIG.4D), seguida por 41,31%, 52,31%, 56,62%, 58,99% e 38,13% de proliferação nas proporções (MSC:PBMC) 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100, respectivamente (FIG.4E-I). Em geral, observou-se que quanto maior número de adMSC em relação a PBMC, maior foi a inibição da proliferação; embora na proporção de 1:100, tenha ocorrido inibição comparável àquela observada na proporção 1:5 (FIG. 4). Para validação do nosso experimento utilizamos controles de PBMCs não marcados com CFSE (FIG. 4A), PBMCs marcadas com CFSE mas não estimuladas com PHA (FIG. 4B) e, como controle positivo, PBMCs marcadas com CFSE, estimuladas com PHA, mas sem a presença das MSCs (FIG. 4C).

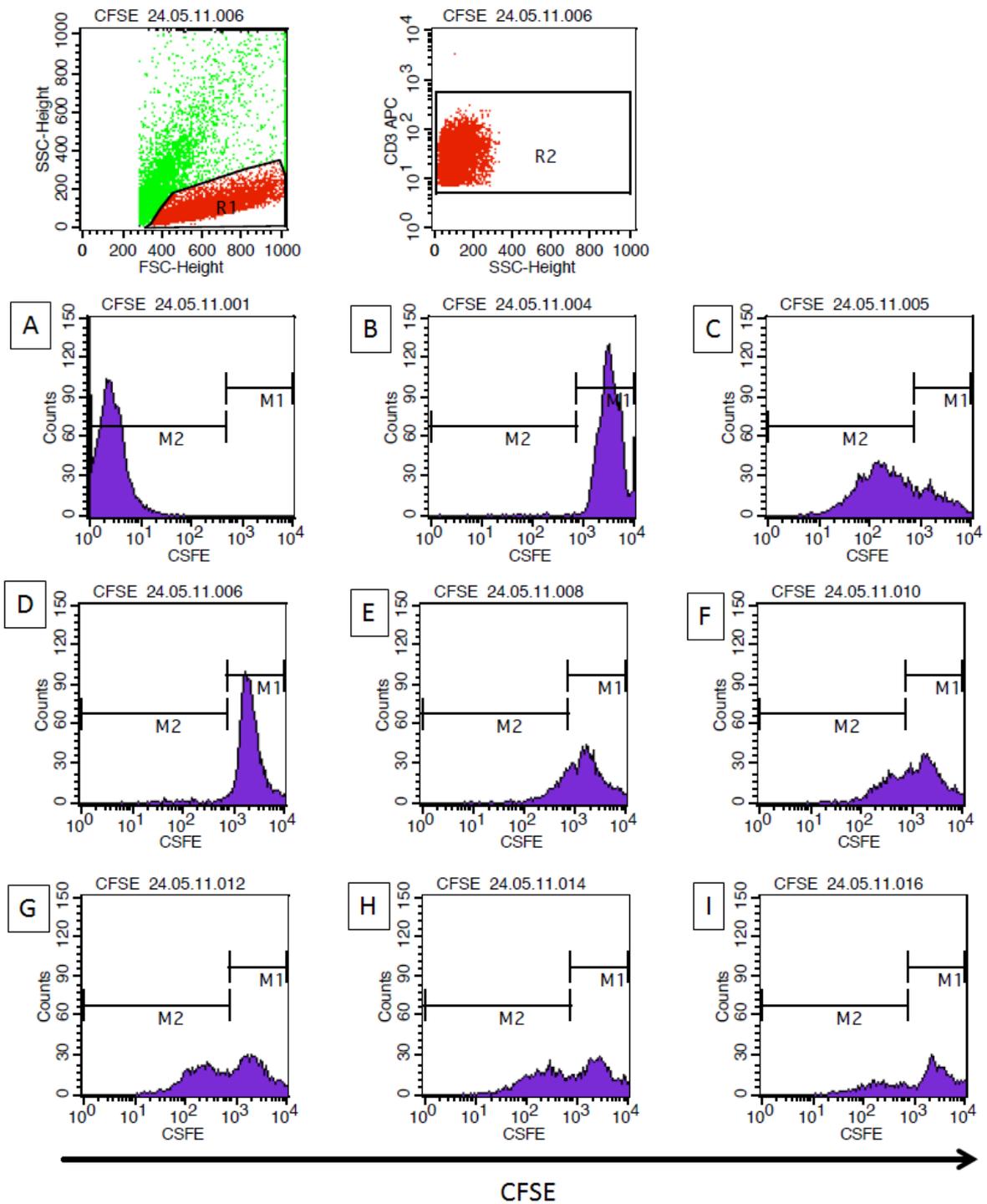


FIGURA 4 - Efeito inibidor de MSCs isoladas de tecido adiposo na proliferação de linfócitos extraídos de indivíduo saudável. A proliferação de linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo, pelo método de CFSE. PBMCs foram isoladas de indivíduo saudável, marcadas com CFSE, estimuladas com PHA e cultivadas na presença de diferentes números de adMSCs [MSC:PBMC 1:2 (D), 1:5 (E), 1:10 (F), 1:20 (G), 1:50 (H) e 1:100 (I)] por 5 dias. Foram adquiridos 50000 eventos na *gate* de células CD3⁺. Os eventos foram representados por histograma de fluorescência 1 (FL1-CFSE). Os números indicam a média da porcentagem de proliferação de linfócitos (duplicata) em relação ao controle negativo. Em (A), PBMCs não marcadas com CFSE; (B) PBMCs marcadas com CFSE não estimuladas com PHA e (C) PBMCs marcadas com CFSE, estimuladas com PHA, mas sem a presença das MSCs – controle positivo.

4.2 Resultados Clínicos

A partir dos resultados obtidos com a caracterização fenotípica e funcional das adMSC, a colite foi induzida em camundongos BALB/c que foram tratados, após 24h, com as MSC xenogeneicas. Primeiramente, foi realizada a infusão de diferentes quantidades de adMSCs nos camundongos doentes para identificarmos a melhor dose de utilização dessas células como terapia e também para se estabelecer o limite mínimo de adMSC requeridas para efeito curativo, *in vivo*. Para tal, foram infundidas $0,25 \times 10^6$, 1×10^6 ou 2×10^6 células por animal, por via intraperitoneal, tendo sido analisados os pesos durante os sete primeiros dias após a indução da DII (FIG. 5A). Foi observado que, mesmo em baixas doses ($0,25 \times 10^6$), as adMSC apresentaram aparentemente efeito curativo na inflamação intestinal induzida experimentalmente, observado pelo ganho de peso (FIG. 5A). Além disso, tanto com 1×10^6 ou $0,25 \times 10^6$ células os animais apresentaram melhora da perda de peso inicial após o tratamento, sendo que a infusão de 1×10^6 adMSC demonstrou efeito terapêutico discretamente superior às demais concentrações, em especial 24h pós-infusão (FIG. 5A, colite vs. 1×10^6 , $p < 0,05$). Neste contexto e com base em outros estudos (González, M 2009), optamos por utilizar a dose de 1×10^6 adMSC por animal nos experimentos subsequentes.

Tendo em vista que a via de administração das adMSC poderia também interferir no seu efeito terapêutico, verificamos, também, qual a melhor via de infusão das células. Para isso, os animais com colite foram tratados pelas vias intraperitoneal ou intrarretal, com 1×10^6 células por camundongo. Em ambas as vias de infusão, os animais apresentaram ganho de peso, com melhora discretamente maior naqueles que receberam as MSCs via intraperitoneal (FIG.5B)

Portanto, a partir destes resultados todos os experimentos seguintes foram realizados com a infusão de 1×10^6 células por camundongo, via intraperitoneal (FIG. 5C). Os animais foram avaliados nos períodos de 3, 7, 14 e 60 dias pós-tratamento. Os resultados demonstraram perda de peso significativa nos camundongos com colite, o que foi recuperado nos animais tratados com adMSC, sendo a principal diferença nos três primeiros dias após a indução da doença e terapia (FIG.5C).

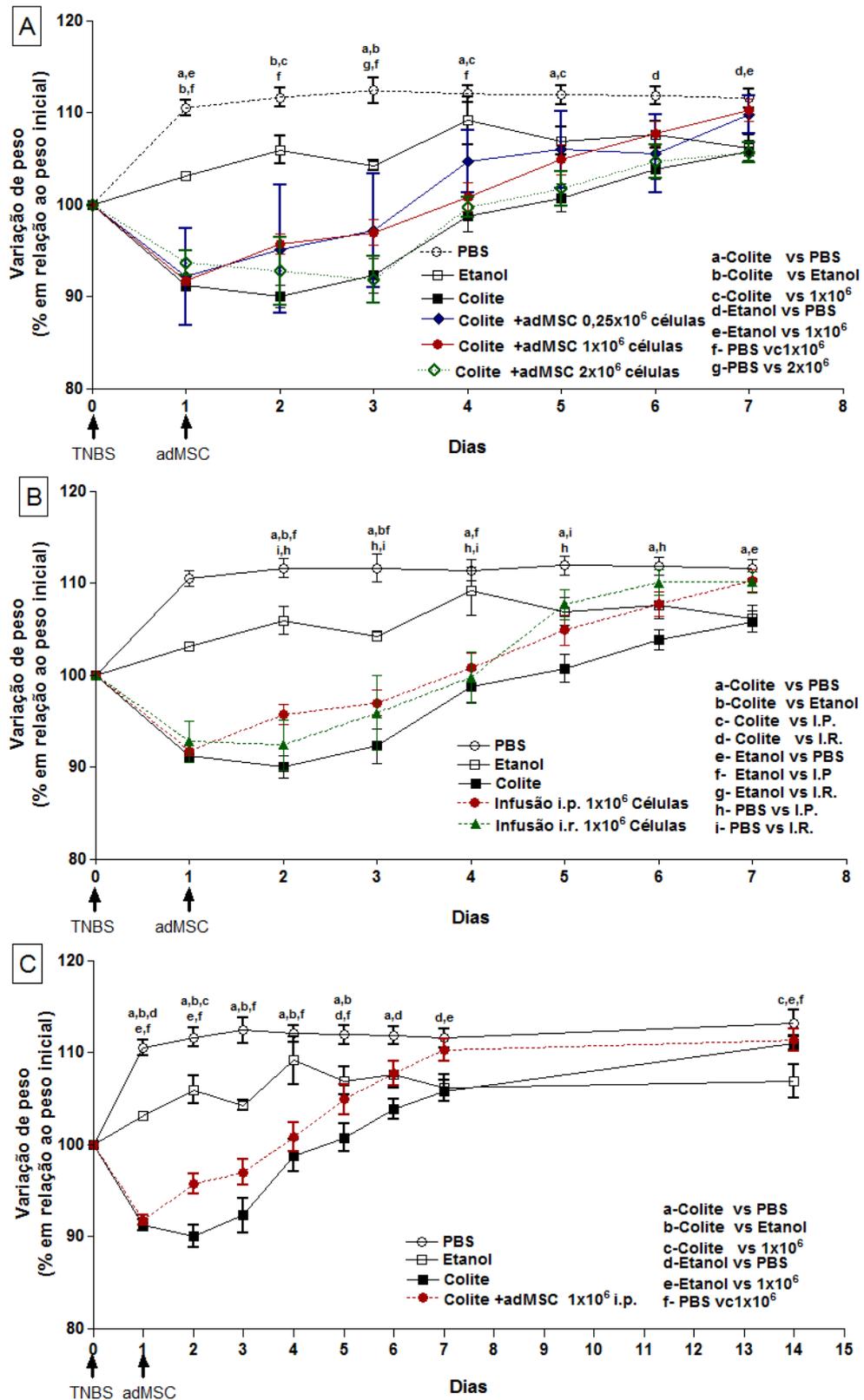


FIGURA 5 - Avaliação do peso de camundongos BALB/c durante os primeiros dias após indução de doença inflamatória intestinal colite e tratamento com células mesenquimais estromais (adMSC). Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução da colite e tratados, após 24h, com injeção de MSC. Os camundongos foram pesados diariamente e os dados representados após cálculo da porcentagem de ganho ou perda de peso em relação ao primeiro dia de indução da DII. **(A)** Infusão das MSCs em concentrações diferentes de $0,25 \times 10^6$, 1×10^6 e 2×10^6 células por animal. **(B)** Infusão das MSCs com injeção intraperitoneal (i.p.) ou intrarretal (i.r.). **(C)** Avaliação do peso dos animais durante 14 dias depois de padronizadas a dose e via de infusão das MSCs. As diferenças significativas entre os grupos são apresentadas por letras (a-i, $p < 0,05$).

Este ganho diferencial de peso nos camundongos tratados com adMSC não parece ser devido a um maior consumo de ração, visto que todos os animais consumiram a mesma quantidade durante o início do período experimental, como visto na FIG 6.

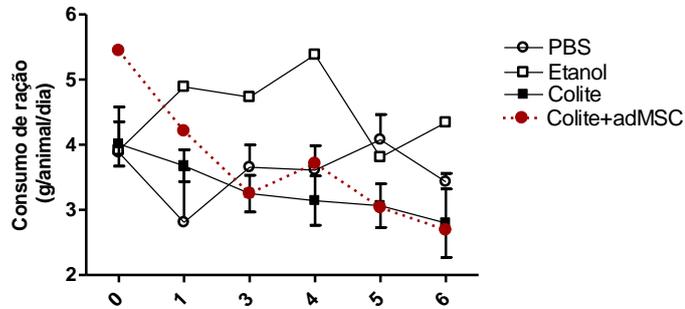


FIGURA 6 – Consumo de ração. A ração foi pesada e foi calculado o consumo diário de cada animal durante o período experimental.

Sabe-se que os principais sinais DII são dor abdominal, diarreia, sangramento retal, perda de peso, febre e fadiga, além de obstrução intestinal e fístulas (Fuss, Heller et al., 2004). Sendo assim, no intuito de se averiguar a gravidade da doença na presença ou ausência de tratamento com adMSC, foi feito um escore clínico com base nos sinais da colite induzida experimentalmente. Ao observamos a presença de diarreia, sangramento, diarreia mais sangue, perda de peso grave e morte, constatamos melhora significativa dos animais que receberam as adMSC em comparação àqueles não tratados (FIG.7A, $p < 0,05$). Ainda, foi observada alta mortalidade dos animais com a DII nos primeiros 7 dias o que não foi visto nos animais que receberam as células (FIG.7B, $p < 0,05$), mostrando que as adMSCs conseguiram melhorar o quadro clínico dos animais (FIG.7A) e impediram a morte devido à inflamação intestinal exacerbada precoce dos mesmos (FIG.7B).

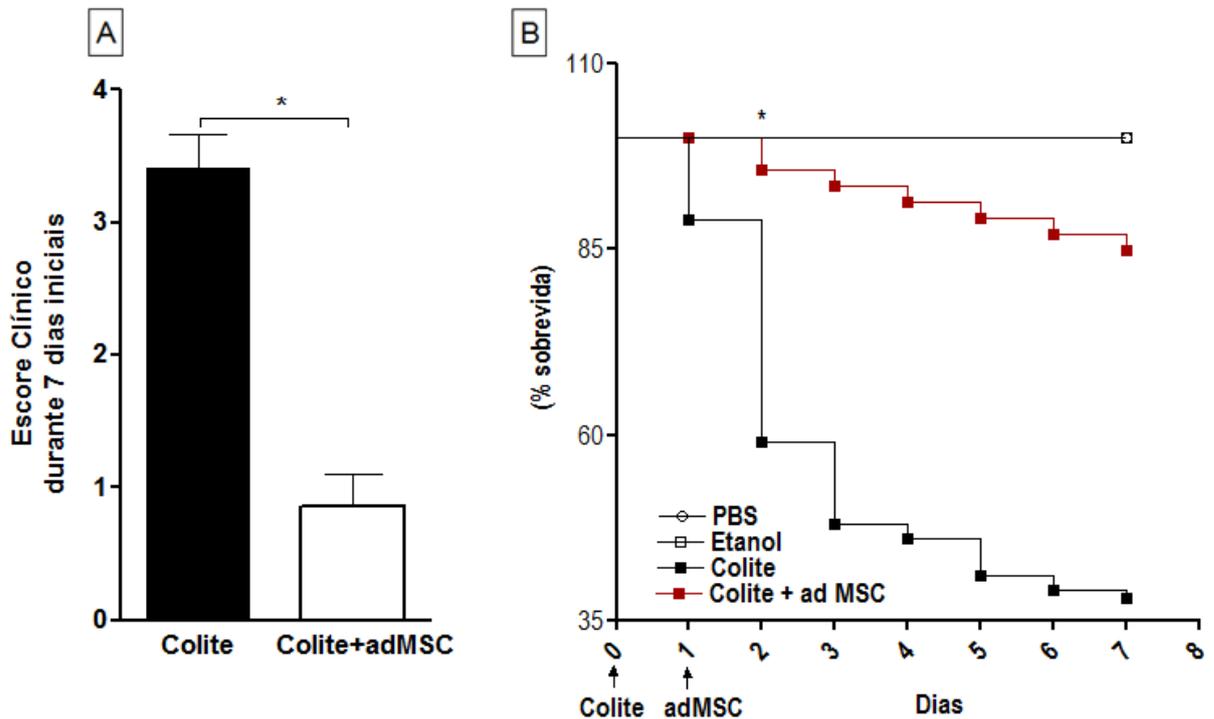


FIGURA 7 - Avaliação do escore clínico e sobrevida dos animais durante os primeiros dias após indução de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e tratamento com adMSC. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de DII e tratados, após 24h, com injeção de MSC. **(A)** Os camundongos foram avaliados diariamente quanto à presença de diarreia, sangramento, diarreia mais sangue, perda de peso grave e morte, para cálculo e demonstração dos respectivos escores clínicos. **(B)** Curva de sobrevida durante os 7 primeiros dias. (* $p < 0,05$).

4.3 ANÁLISES MACROSCÓPICAS E HISTOLÓGICAS

Os camundongos com a colite e que receberam infusão de adMSCs foram eutanasiados com 3, 7, 14 e 60 dias e foi coletado o intestino grosso para avaliação macroscópica, já que o encurtamento do cólon é uma das características que define o processo inflamatório intestinal. De fato, este encurtamento foi visto nos animais com colite enquanto os camundongos tratados apresentaram cólon de extensão comparável àqueles controles, que receberam apenas PBS (FIG.8).

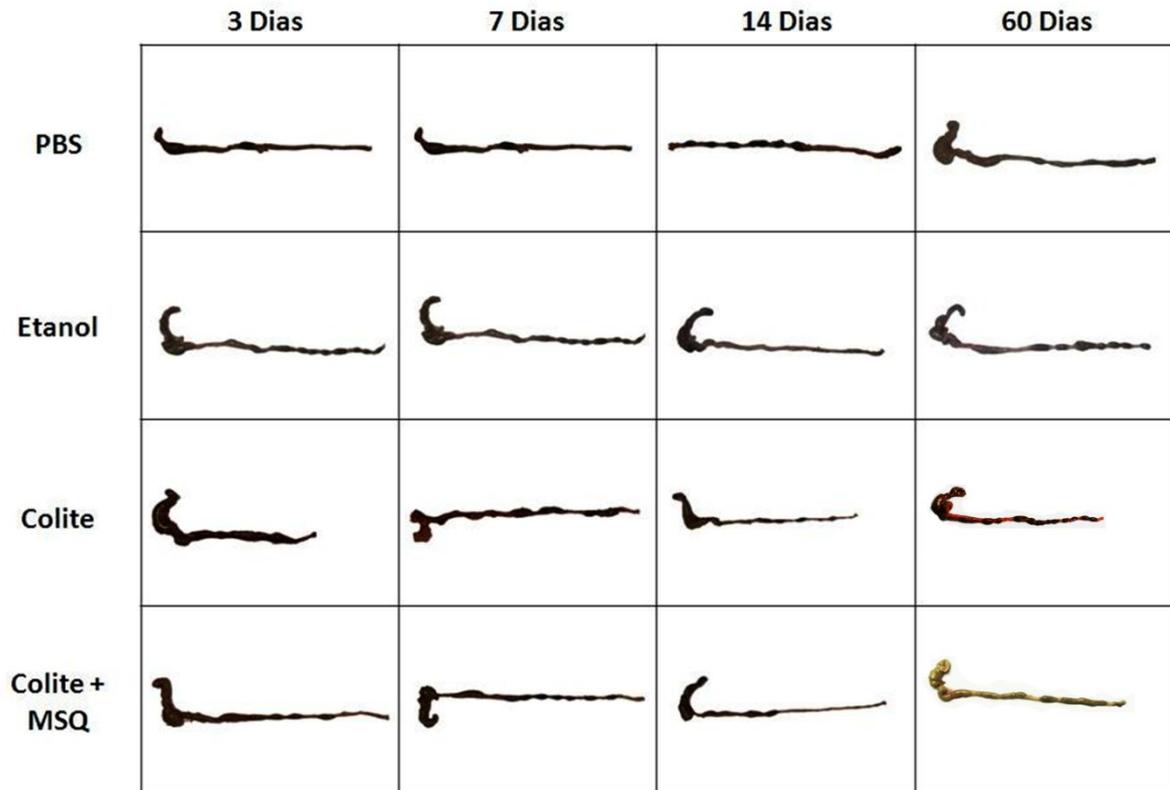


FIGURA 8 - Análise macroscópica do intestino grosso. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de PBS, ou etanol ou ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e o grupo tratado recebeu, após 24h, injeção intraperitoneal de células mesenquimais estromais (adMSC). Após 3, 7, 14 e 60 dias, os camundongos tiveram o cólon removido e fotografado para análise comparativa entre os grupos.

Para melhor visualização das áreas afetadas pela colite, foram realizadas análises histopatológicas do cólon dos camundongos controles PBS, etanol (veículo do TNBS), animais com a colite e os que receberam tratamento com as adMSCs.

No grupo PBS, a mucosa do intestino grosso apresentou uma superfície epitelial plana com presença de criptas dispostas em formas retas e paralelas sem anormalidades arquitetônicas da cripta ou lâmina própria e celularidade dentro da normalidade. Essas características foram constantes aos 3, 7 e 14 dias analisados. Não foi observada infiltração de polimorfonucleares na lâmina própria, no epitélio da cripta ou no seu interior, assim como de linfócitos intraepiteliais. Também não foram observadas anormalidades epiteliais tais como, achatamento do epitélio, depleção de mucina, perda focal de células e/ou erosão, tampouco úlcera. Não foram observados infiltrados inflamatórios na submucosa (FIG. 9A-D).

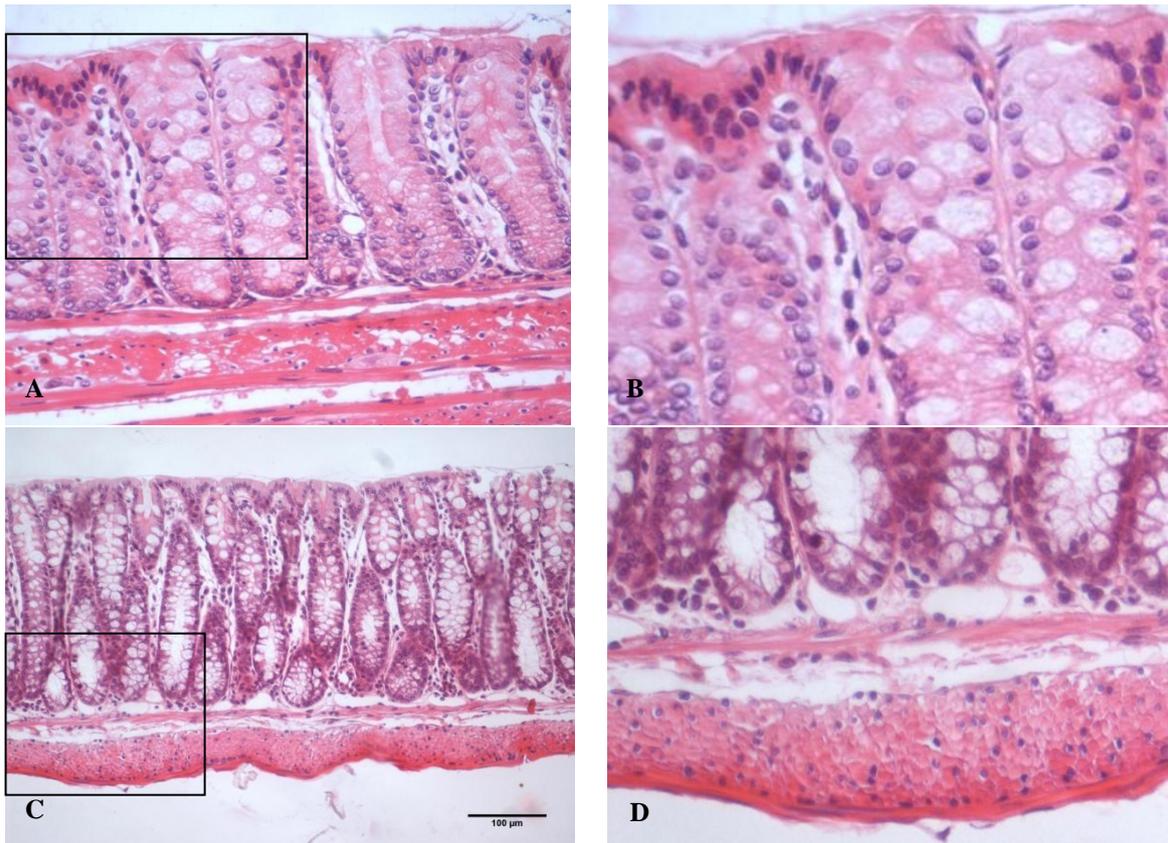


FIGURA 9 - Análise histopatológica do intestino grosso de animais controles com infusão de PBS. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de PBS. Após 3, 7 e 14 dias, os camundongos tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise morfométrica. Em **A** e **C** (Objetiva de 40X) mucosa do intestino com superfície epitelial plana, criptas paralelas e células caliciformes, lamina própria (LP) com celularidade dentro da normalidade. Em **B** e **D** área de aumento dos requadros de **A** e **C** mostrando as características da mucosa.

No grupo **etanol**, a superfície epitelial da mucosa do intestino grosso apresentou-se com as mesmas características que o grupo PBS; porém, com aumento discreto e focal da celularidade da lâmina própria. Esse aumento foi caracterizado como infiltrado misto com predomínio de células mononucleadas nos dias 3, 7 e 14 analisados. Não foi observada infiltração de polimorfonucleares no epitélio da cripta ou no seu interior, assim como de linfócitos intraepiteliais. Também não foram observadas anormalidades epiteliais tais como achatamento do epitélio, depleção de mucina, perda focal de células e/ou erosão. Foi observado infiltrado inflamatório, focal e discreto, na submucosa (FIG. 10A-D).

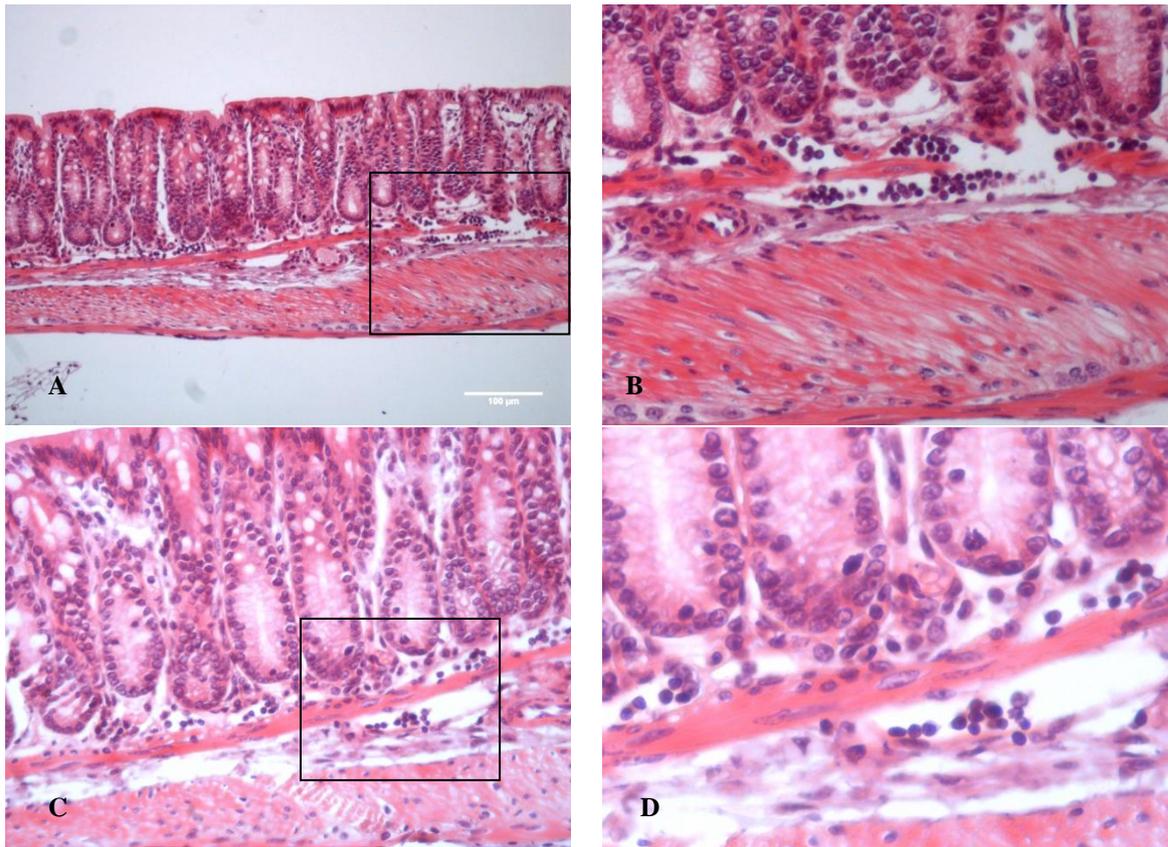


FIGURA 10 - Análise histopatológica do intestino grosso de animais controles com infusão de etanol. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de etanol. Após 3, 7 e 14 dias, os camundongos tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise morfológica. Em **A e C** mucosa mostrando o epitélio normal e lâmina própria com celularidade discretamente aumentada e focal com predomínio de células mononucleadas na base da LP; em **B e D** área de aumento dos requadros de **A e C** mostrando o predomínio de células mononucleadas na base da LP e na submucosa, de forma discreta e focal. Também observa-se no colo das glândulas tubulares a presença de mitoses.

No grupo **com a colite** foram observadas, no terceiro dia, extensas áreas de erosão (perda de epitélio superficial e de glândulas tubulares) e úlceras (a lesão ultrapassou a muscular da mucosa), intercaladas, na borda dessas lesões, com epitélio superficial irregular e criptas dilatadas (anormalidades arquitetônicas da criptas). Estas apresentavam infiltrado de polimorfonucleares na superfície do epitélio ou no interior da cripta caracterizando uma criptite e/ou abscesso de cripta. Também foi observada a presença de anormalidades epiteliais nas criptas tais como, achatamento do epitélio e depleção de mucina. A celularidade da lâmina própria apresentava infiltrado inflamatório misto de graus variados de intensidade, sendo acentuado nas áreas de erosão e úlcera (FIG. 11 A-D).

Foram observados linfócitos intraepiteliais aos 3 dias, com diminuição destes achados aos 7 e 14 dias. Aos 7 dias foi evidente a re-epitelização da mucosa, onde houve erosão e/ou ulceração. Na borda dessas áreas as criptas apresentavam bifurcação e depleção de mucina. Também foram observadas áreas de pseudo-estratificação nuclear do epitélio e nos colos glandulares aumento das mitoses. A lâmina própria apresentou edema aparente com presença de fibroblastos jovens e infiltrado misto de graus variados. A submucosa apresentou também infiltrados mistos de moderada a acentuada intensidade (FIG. 11E e F).

Aos 14 dias após indução de colite foi possível observar projeções vilosas, bifurcação de criptas, revestidas com epitélio colunar e células caliciformes. O infiltrado inflamatório da lâmina própria se manteve misto e de graus variados, porém, com predomínio de mononucleares (FIG. 11G e H).

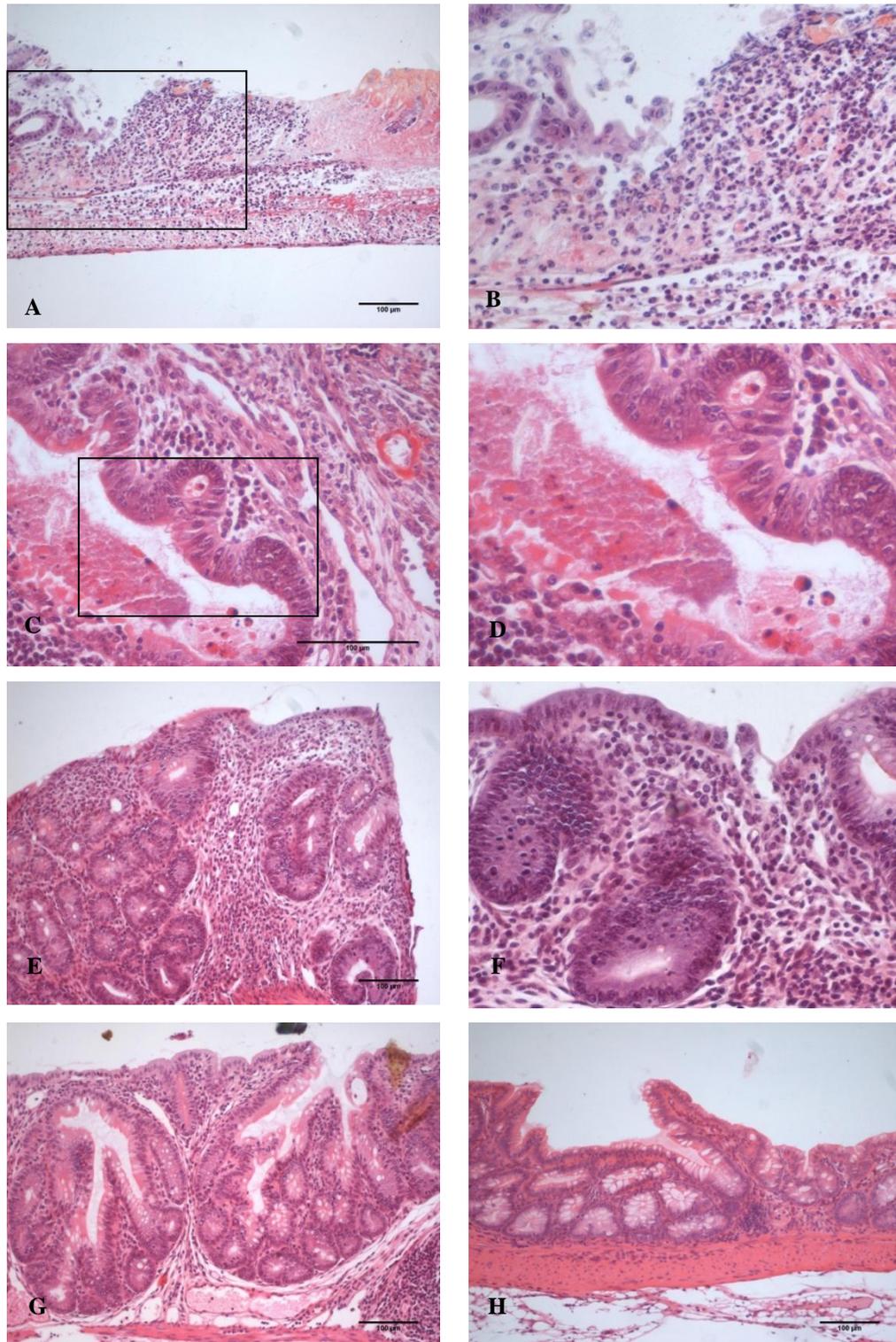


FIGURA 11 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais com colite. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite. Após 3, 7 e 14 dias, os camundongos tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise morfométrica. **A, B, C e D** correspondem ao grupo **colite 3 dias**. Em **A**, lesão ulcerada da mucosa do intestino com perda de glândulas tubulares e lâmina própria com acentuado infiltrado inflamatório misto (objetiva de 20X). Em **B**, ampliação do requadro de **A**. Em **C**, borda da úlcera com criptas dilatadas, células inflamatórias no epitélio da cripta e no interior. Em **D**, aumento do requadro de **C**. Em **E, F** (objetivas de 20 e 40X respectivamente) **grupo de 7 dias** com pseudoestratificação nuclear do epitélio da cripta e presença de fibroblastos jovens. Em **G e H** (objetiva de 40X) **grupo de 14 dias** com bifurcação de criptas, presença de células caliciformes e, em **H**, projeções vilosas.

No grupo **colite tratado com MSC** foram observadas, no terceiro dia, as mesmas características do grupo DII; porém, aparentemente, com maior frequência, de áreas de re-epitelização intercaladas com as lesões. Nessas áreas os infiltrados de polimorfonucleares foram evidentes na superfície do epitélio. Também foi observada a presença de anormalidades epiteliais nas criptas tais como, achatamento do epitélio e depleção de mucina, pseudo-estratificação nuclear do epitélio e nos colos glandulares aumento das mitoses. Alterações arquiteturais como dilatação e bifurcação das criptas também estiveram presentes. A celularidade da lâmina própria apresentava infiltrado inflamatório misto de graus variados de intensidade, sendo acentuado nas áreas próximas da erosão, úlcera e entremeados à presença de fibroblastos jovens. Na submucosa houve também infiltrado misto de moderada a acentuada intensidade, que nas áreas da úlcera se estendia até a muscular propriamente dita (FIG.12).

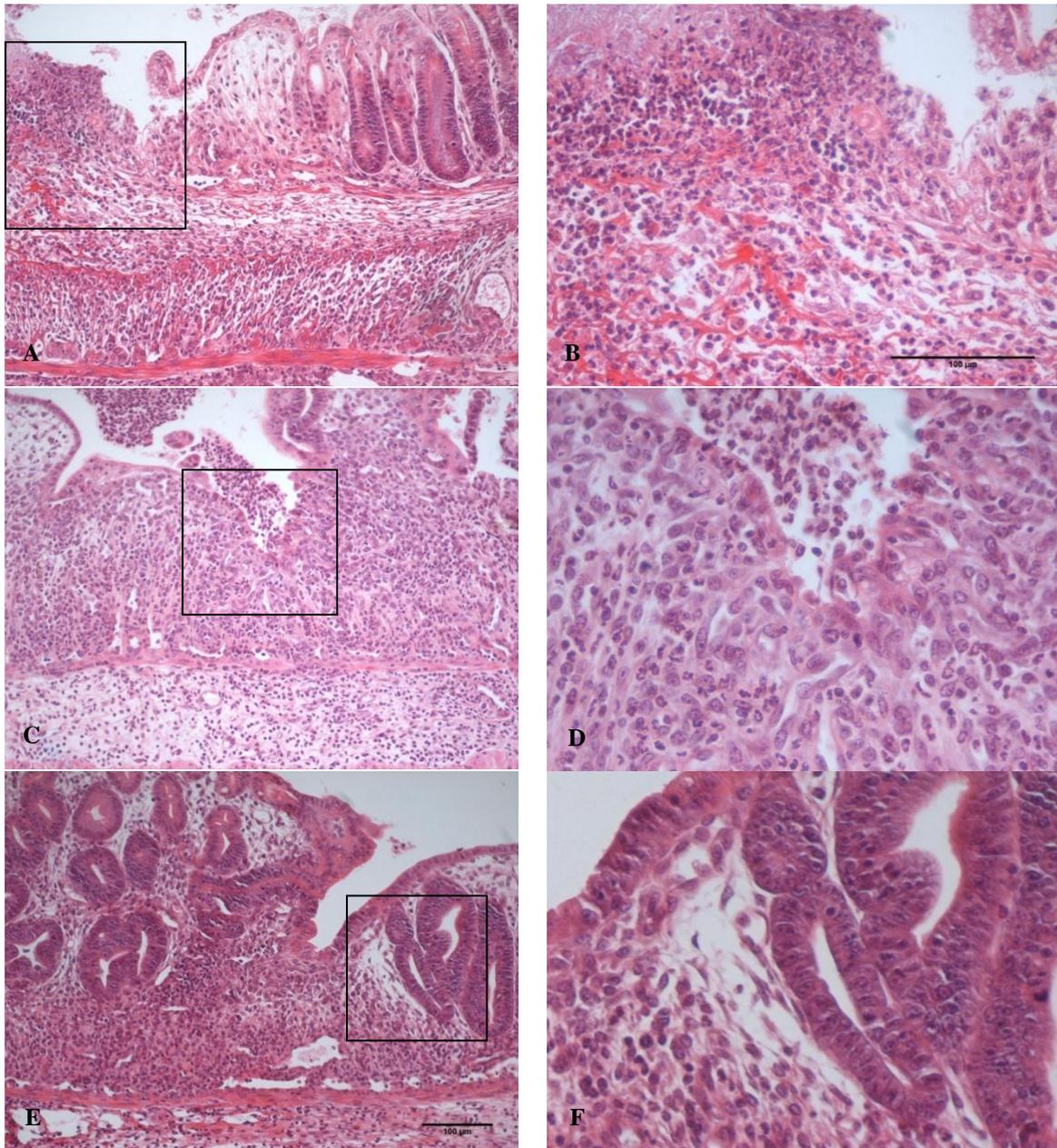


FIGURA 12 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais aos 3 dias com colite tratados com as adMSCs. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e, após 24h, tratados com as células mesenquimais estromais (adMSCs). Após 3 dias, os camundongos tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise morfológica. Em **A**, lesão ulcerada da mucosa do intestino com edema na borda e perda de glândulas tubulares. Na lâmina própria acentuado infiltrado inflamatório de tipo misto (objetiva de 20X). Em **B**, ampliação do requadro de **A**, o infiltrado se estende até a serosa. Em **C**, área de re-epitelização com áreas de epitélio cúbico na superfície e perda de criptas. Observaram-se células inflamatórias na superfície epitelial e na lâmina própria entremeadas a fibroblastos. Em **D** ampliação do requadro de **C**. Em **E** (objetiva de 20X) é possível observar áreas de pseudoestratificação nuclear do epitélio da cripta e depleção de mucina, assim como presença de fibroblastos jovens. Em **F**, ampliação do requadro de **E**.

Aos 7 dias se mantiveram as características descritas com 3 dias; no entanto, não foram observadas áreas de erosão ou úlceras da mucosa. Foram

observadas também áreas de ausência de cripta na mucosa; porém, a superfície se apresentava re-epitelizada (FIG.13A e B).

Com 14 dias foi possível observar bifurcação de criptas, revestidas com epitélio colunar e células calciformes. O infiltrado inflamatório da lamina própria se manteve misto e de graus variados; porém com predomínio de mononucleares. Nas áreas distantes das lesões a mucosa se encontrava preservada (FIG.13 C-F).

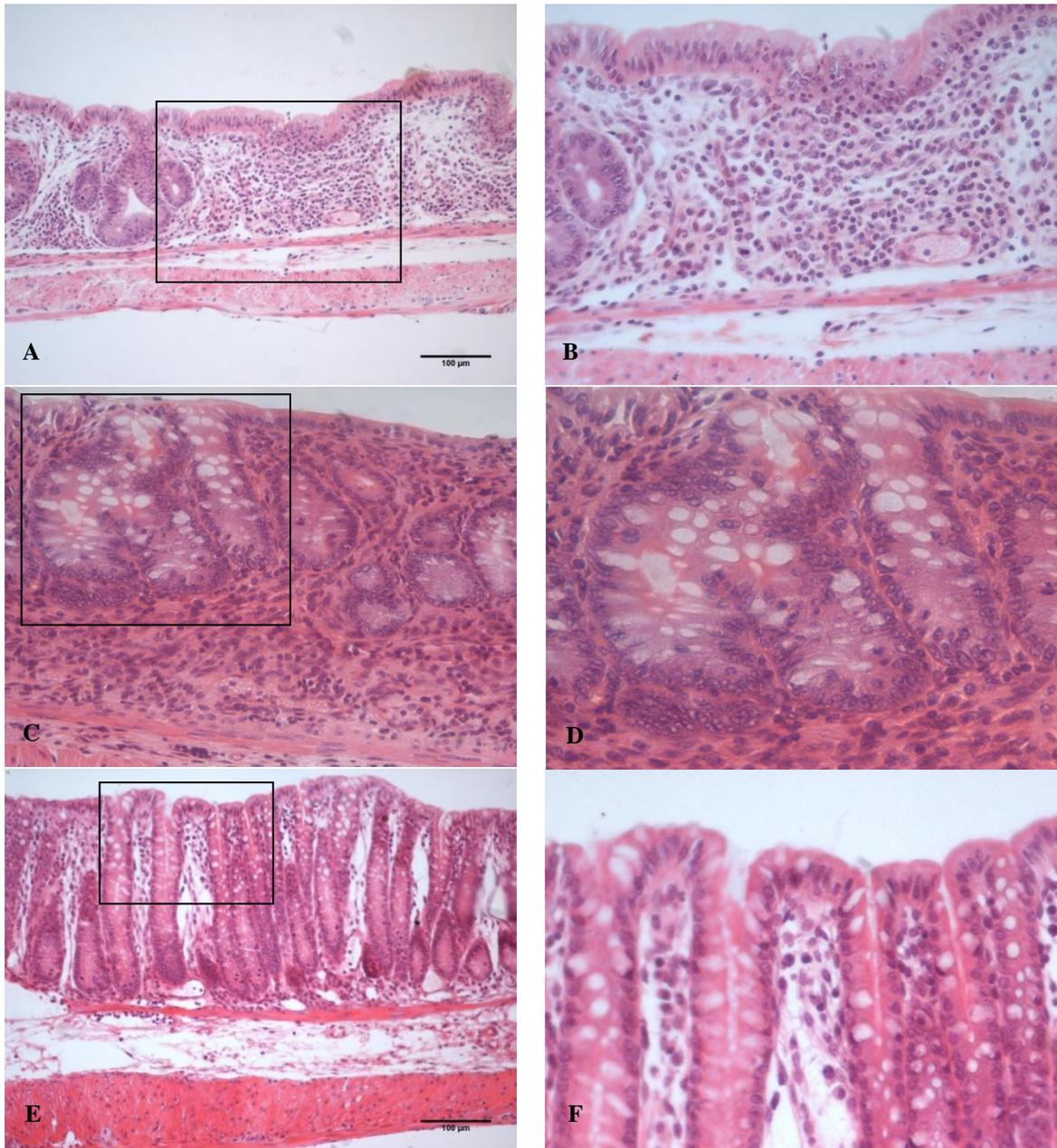


FIGURA 13 - Análise histopatológica do intestino grosso dos animais aos 7 e 14 dias com colite tratados com as adMSCs. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e após 24h, tratados com as células mesenquimais estromais (adMSCs). Após 7 e 14 dias, os camundongos tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise morfométrica. Fotos **A** e **B** correspondem ao grupo **colite+MSCs de 7 dias**. Em **A**, área de re-epitelização da mucosa do intestino com células colunares e presença de células caliciformes (na superfície). Perda de glândulas tubulares na lâmina própria com moderado infiltrado inflamatório misto (objetiva de 20X). Em **B**, ampliação do requadro de **A**; Fotos de **C** a **F** correspondem ao grupo de **14 dias**. Em **C**, glândulas tubulares bifurcadas com presença de células caliciformes e com uma lâmina própria de celularidade aumentada. Em **D**, aumento do requadro de **C**. Em **E** (objetiva de 20X) a mucosa com epitélio superficial e glândulas tubulares apresentou aparente restituição das características de normalidade, mantendo discreto infiltrado inflamatório na base da LP. Em **F** aumento do requadro de **E**.

Quando comparamos as histologias dos animais com a colite e animais tratados aos 3 dias, observamos semelhança nos achados com presença de

anormalidades epiteliais nas criptas e infiltrado inflamatório misto de graus variados mas de maior intensidade naqueles com a colite, enquanto nos tratados havia presença de fibroblastos jovens (FIG. 14A e B). Aos 7 dias observamos nos animais com a colite áreas de pseudo-estratificação nuclear do epitélio e a lâmina própria apresentou edema aparente com presença de fibroblastos jovens e a submucosa apresentou também infiltrados mistos de moderada a acentuada intensidade, e quando tratados não apresentaram áreas de erosão ou úlceras da mucosa, observando também superfície re-epitelizada (FIG. 14C e D).

Já com 14 dias de indução da colite observamos que o infiltrado inflamatório da lâmina própria se manteve misto e de graus variados, porém, com predomínio de mononucleares. Nos animais tratados foi possível observar que o infiltrado inflamatório se manteve misto e nas áreas distantes das lesões a mucosa se encontrava preservada (FIG.14E e F).

Para verificar a segurança e viabilidade do tratamento de colite com as adMSC, amostras de órgãos de animais que receberam a infusão das adMSC também foram avaliadas em lâminas coradas por H&E. A análise histopatológica dos diferentes órgãos (fígado, coração, baço, rim, músculos, pulmões, estômago, intestino delgado e cérebro) não revelou nenhum tipo de neoformação tecidual, sendo considerados os mesmos, tecidos dentro dos parâmetros da normalidade, nos períodos de 7, 14 e 60 dias após a infusão de adMSC (dados não mostrados). Estes dados sugeriram que esta pode ser, de fato, uma terapia segura para a colite, sob o ponto de vista histopatológico.

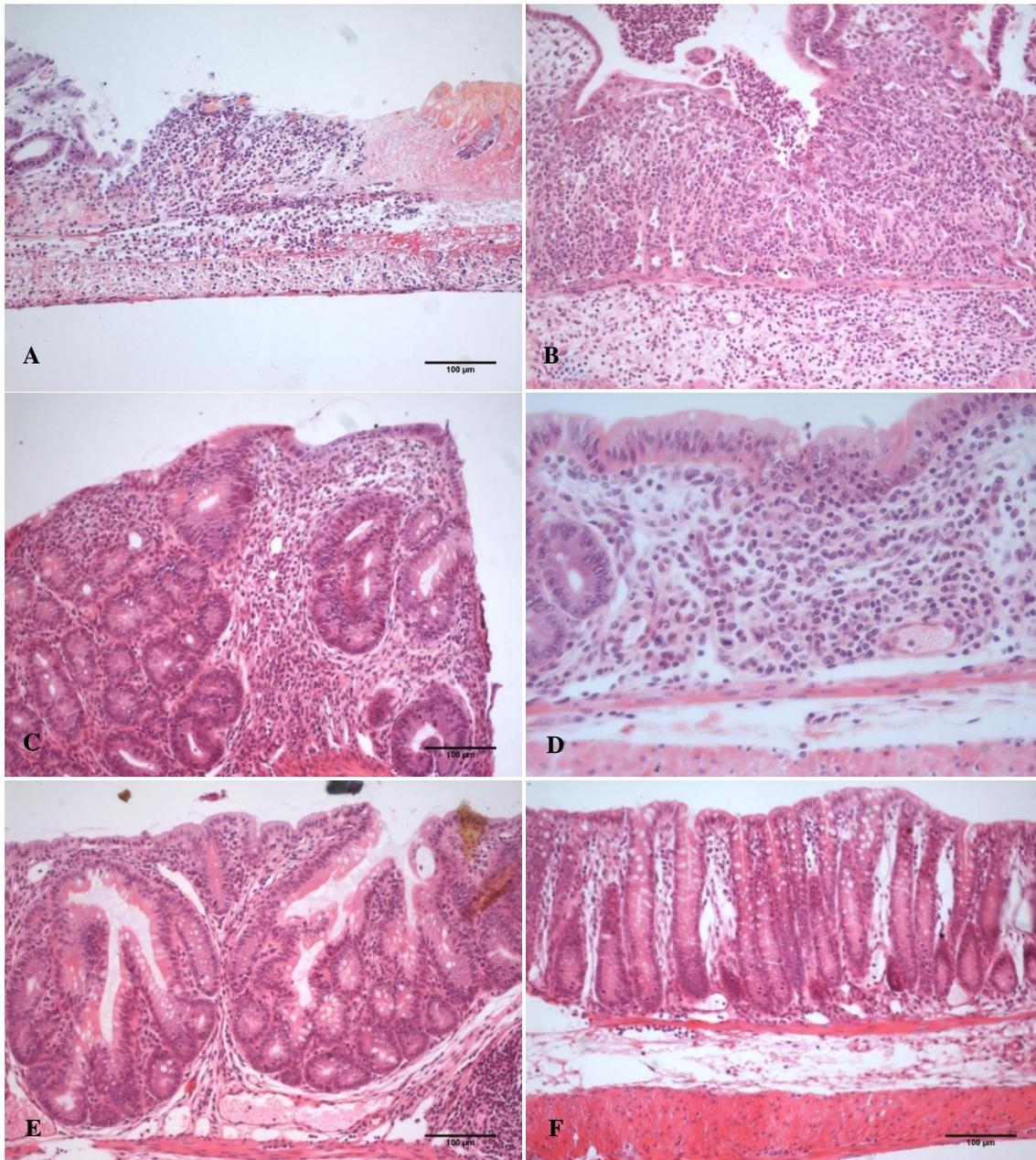


FIGURA 14 – Comparação das análises histopatológicas do intestino grosso de animais com a colite e após tratamento com as adMSCs. Os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intrarretal de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para indução de colite e, após 24h, tratados com as células mesenquimais estromais (adMSCs). Após 3, 7 e 14 dias, os camundongos tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise morfológica. Em **A** animais com colite 3 dias, lesão ulcerada da mucosa do intestino com perda de glândulas tubulares e lâmina própria com acentuado infiltrado inflamatório misto. Em **B**, animais com 3 dias de tratamento, apresentando área de re-epitelização com áreas de epitélio cúbico na superfície e perda de criptas. Observaram-se células inflamatórias na superfície epitelial e na lâmina própria entremeadas a fibroblastos. Animais com a colite de 7 dias em **C**, com pseudoestratificação nuclear do epitélio da cripta. Em **D**, tratados com 7 dias apresentando área de re-epitelização da mucosa do intestino com células colunares e presença de células caliciformes (na superfície). Em **E**, grupo de 14 dias com a colite, no qual se observou bifurcação de criptas, presença de células caliciformes. Animais tratados com 14 dias em **F**, a mucosa com epitélio superficial e glândulas tubulares apresentou aparente restituição das características de normalidade, mantendo discreto infiltrado inflamatório na base da LP (Objetiva de 20X).

4.4 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

4.4.1 Neutrófilos e eosinófilos

A análise quantitativa do infiltrado inflamatório de neutrófilos e eosinófilos na DII e sua relação com o tratamento com adMSC foi realizada por meio dos ensaios de mieloperoxidase (MPO) e eosinófilo-peroxidase (EPO), respectivamente, nas amostras de tecido intestinal coletadas de camundongos controles, doentes e tratados com adMSC. De forma geral, os camundongos submetidos ao protocolo de indução de inflamação intestinal apresentaram maior acúmulo de eosinófilos e neutrófilos no cólon em relação ao grupo não inflamado PBS (Fig.15). Os resultados mostraram aumento da enzima eosinófilo-peroxidase nos grupos etanol e colite tratado com adMSC em comparação ao grupo com a colite. Esta diferença foi especialmente significativa quando este aumento foi comparado ao grupo controle PBS aos 3 dias (Fig.15A, $p < 0,05$). Aos 7 dias ocorreu aumento da EPO no grupo etanol quando comparado com o controle PBS e discretamente aumentado no grupo tratado em relação ao grupo com a colite (Fig.15C). Quando comparamos o grupo PBS com o grupo da DII e tratados com as adMSCs, observamos aumento significativo com 14 dias (FIG.15E, $p < 0,05$). Já com 60 dias vimos aumento significativo no grupo etanol comparado com PBS e aumento nos grupos tratados com as adMSCs (FIG.15G, $p < 0,05$). Com relação à enzima mieloperoxidase, observamos resultados especialmente significativos aos 3 e 7 dias, com aumento nos animais com a colite quando comparados ao grupo controle com PBS, enquanto os animais tratados apresentaram diminuição da MPO quando comparados com os colite (FIG.15B e D, respectivamente, $p < 0,05$). Os animais de 14 e 60 dias com a colite, apresentaram resultados aumentados significativos em relação ao grupo PBS e também mostraram resultados diminuídos nos tratados quando comparados com os animais com a colite (FIG.15F e H, respectivamente, $p < 0,05$). Estes dados sugerem que esta nova terapia proposta para tratamento de colite é supostamente efetiva e pode interferir no acúmulo de eosinófilos e neutrófilos no sítio da doença.

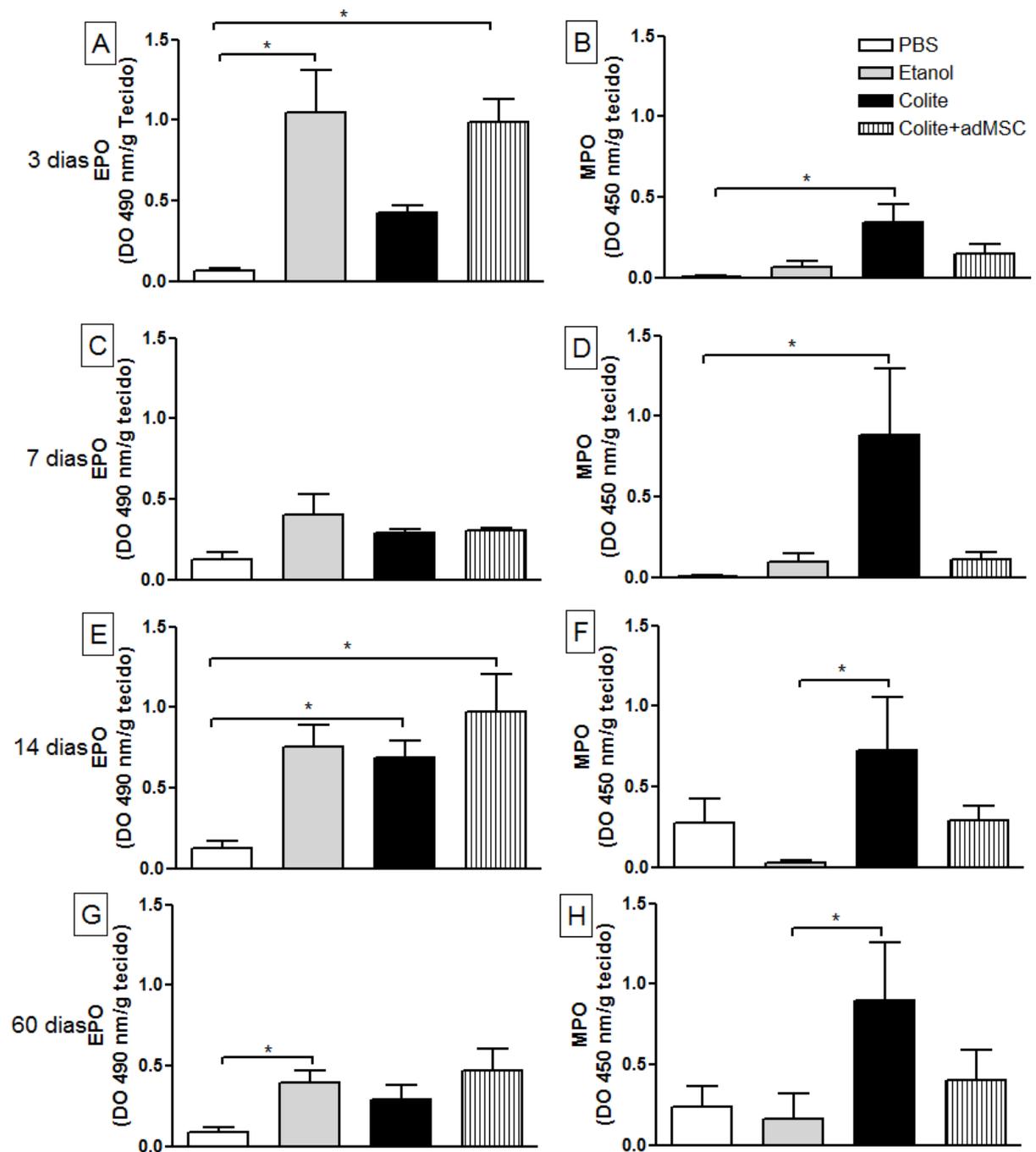


FIGURA 15 - Avaliação da atividade das enzimas eosinófilo-peroxidase (EPO) e mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos com colite e tratados com adMSC. Os fragmentos de intestino foram coletados, triturados e, processados para os ensaios de EPO e MPO, com leitura da densidade óptica dos sobrenadantes a 490 e 450 nm, respectivamente. Em (A), (C), (E) e (G) avaliação de EPO nos dias 3, 7, 14 e 60, respectivamente. Em (B), (D), (F) e (H) quantificação de MPO nos dias 3, 7, 14 e 60, respectivamente. * p < 0,05.

4.4.2 Leucócitos e células CD3⁺

A DII é causada por um processo inflamatório crônico multifatorial com importante participação do infiltrado inflamatório intestinal na destruição da mucosa. Sabendo disso, buscamos averiguar e quantificar as alterações no infiltrado inflamatório no intestino grosso dos animais doentes e tratados com as adMSCs, por citometria de fluxo. Para isso, primeiramente as amostras do cólon foram coletadas e processadas para separação da lâmina própria (LP) e dos linfócitos intraepiteliais (IEL) nos períodos de 7, 14 e 60 dias, quando foram quantificados os leucócitos totais com o auxílio da câmara de Neubauer. Verificamos que após o tratamento com as adMSCs ocorre diminuição de leucócitos presentes na área, principalmente com 14 dias de tratamento, tanto na LP como no compartimento IEL, assim como na LP aos 60 dias (FIG. 16A e 16C, $p < 0,05$). Também verificamos se o tratamento com MSC poderia interferir no recrutamento e/ou acúmulo de linfócitos T no intestino grosso, onde as células mononucleares foram marcadas com anticorpo anti-CD3 conjugado a fluorocromo e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Foi observada redução da frequência de linfócitos T da LP dos camundongos tratados com MSC, quando comparados aos grupos que receberam apenas o enema intrarretal de TNBS para indução da colite, especialmente aos 14 dias (FIG.16B, $p < 0,05$).

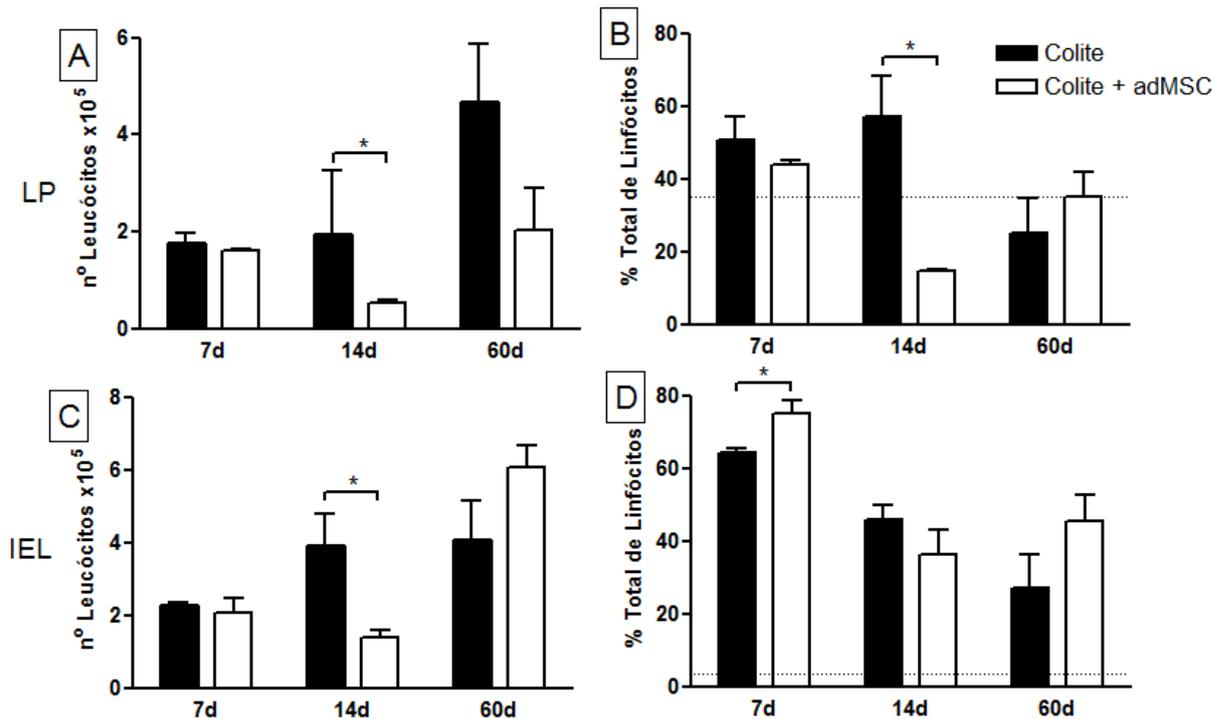


FIGURA 16 - Avaliação do infiltrado inflamatório após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. O intestino grosso dos animais foi removido para separação da lâmina própria e linfócitos intraepiteliais, para contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer (**A e C**), ou citometria de fluxo após marcação com anticorpo específico para a molécula CD3 (linfócitos T) (**B e D**). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células CD3⁺ foi analisada na “gate” de linfócitos de acordo com parâmetros de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) no software FlowJo. * p < 0,05. **Linha tracejada:** animais controles etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

4.4.3 Células NK, NKT e linfócitos T

Tendo em vista os resultados encontrados no intestino grosso, buscou-se averiguar quais populações poderiam estar alteradas nos linfonodos mesentéricos (LN) e no baço (BÇ) dos animais eutanasiados com 7, 14 e 60 dias após a indução da colite e tratamento com as adMSCs. Verificou-se discreto aumento na frequência de células T CD3⁺ em todos os períodos nos linfonodos mesentéricos (FIG.17A) e baço (FIG.17B) dos animais tratados, em especial aos 7 dias no baço em comparação aos animais doentes não tratados (FIG. 17B, p < 0,05). Dentre a população de células CD3⁺, observou-se aumento aparente dos linfócitos CD3⁺CD49b⁺ (supostamente NKT) nos linfonodos mesentéricos com 60 dias de tratamento (FIG.17C) e redução no baço aos 7 (p < 0,05) e 14 dias (FIG. 17D). De forma similar, foi observado aumento da frequência de células *natural killer* CD49b⁺ nos linfonodos mesentéricos aos 60 dias (FIG. 17E, p < 0,05) e diminuição no baço

com 14 dias de tratamento, ao comparar-se com os animais doentes não tratados (FIG.17F, $p < 0,05$), sugerindo uma possível modulação da resposta imune de mucosa dependente destas células, após a infusão de adMSC.

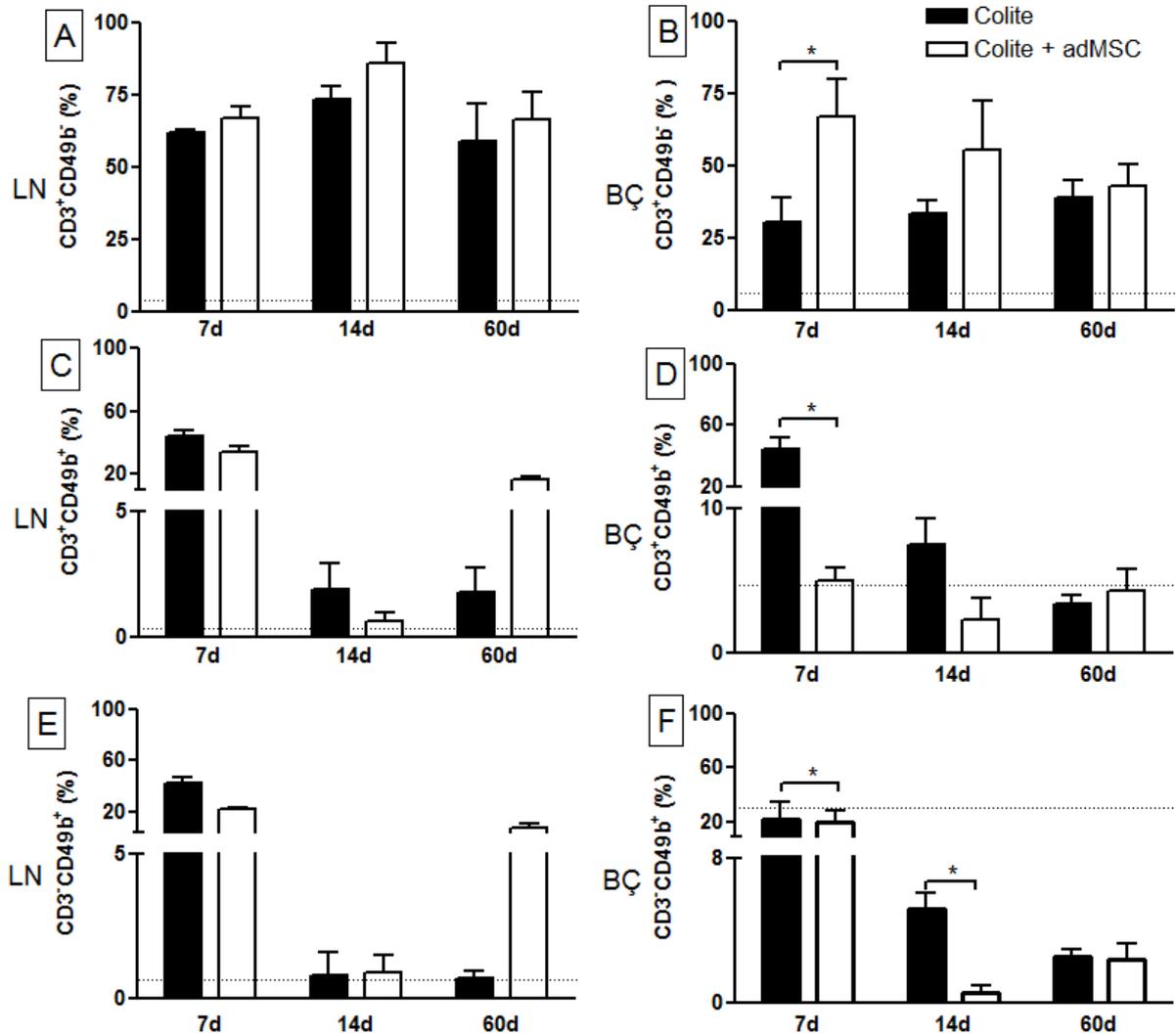


FIGURA 17 - Avaliação do infiltrado inflamatório dos linfonodos mesentéricos e baço após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. Os linfonodos mesentéricos e o baço dos camundongos foram removidos e macerados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE) e CD49b (FITC). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de linfócitos CD3⁺ (A e B), duplo positivos CD3CD49b (NKT) (C e D) ou simples positivos CD49b (NK) (E e F) foi analisada pelo software FlowJo. * $p < 0,05$. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

4.4.4 Linfócitos CD4⁺ e CD8⁺

Para verificar se o tratamento com adMSC também poderia interferir no recrutamento e/ou acúmulo de linfócitos TCD4 e TCD8 na LP, linfonodos mesentéricos (LN) ou baço (BÇ), foi realizada imunofenotipagem dos leucócitos

obtidos destes compartimentos dos camundongos controles, doentes e tratados, após 7, 14 e 60 dias de infusão de adMSC. Foi observada tendência de aumento da frequência de linfócitos $CD3^+CD4^+$ na LP dos camundongos tratados com MSC, em todos os períodos avaliados (FIG.18A), com aumento significativo nos LN aos 7 dias e baço aos 14 dias em comparação aos animais doentes não tratados (FIG. 18B e 18C, respectivamente, $p < 0,05$). Já em relação aos linfócitos $CD3^+CD8^+$ houve redução significativa na frequência dessas células nos LN dos camundongos tratados em comparação ao grupo colite, no dia 14 (FIG.18E, $p < 0,05$), com tendência ao aumento na LP aos 60 dias e baço 14 dias (FIG. 18D e 18F, respectivamente).

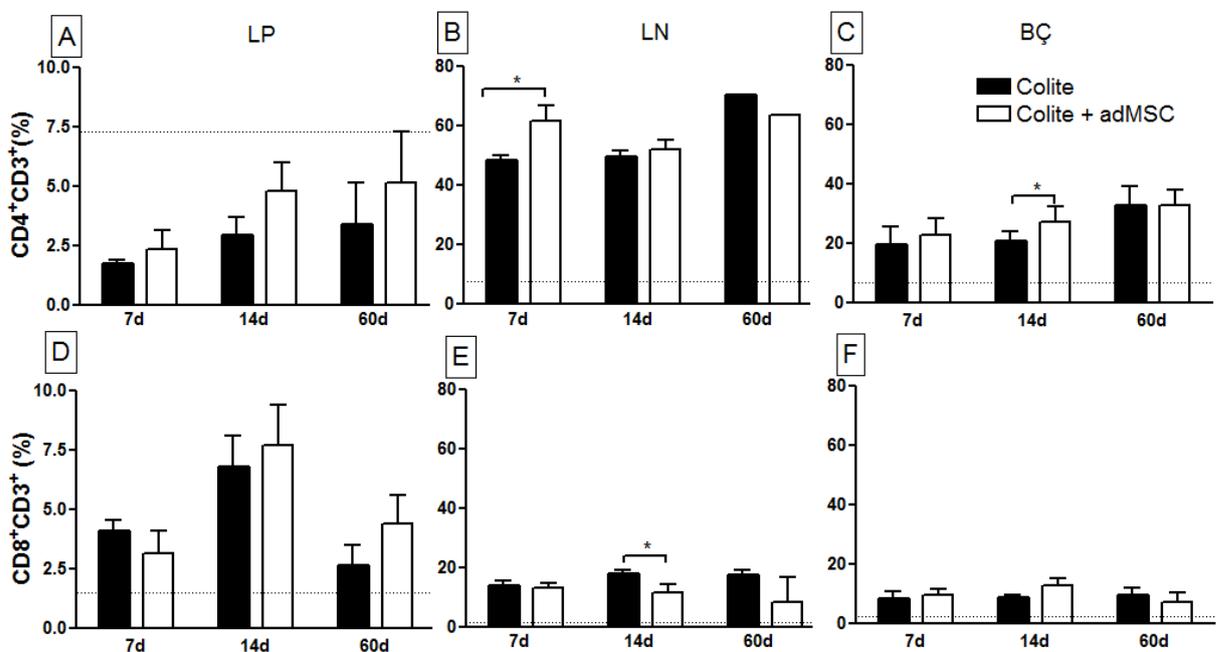


FIGURA 18 - Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. A lâmina própria (LP, A e D), linfonodos mesentéricos (LN, B e E) e baço (BÇ, C e F) foram removidos e processados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE), CD4 (PeCy5) e CD8 (FITC). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células duplo positivas CD3CD4 (A, B, e C) ou CD3CD8 (D, E e F) foi analisada pelo software FlowJo. * $p < 0,05$. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

Sabendo que os linfócitos intraepiteliais representam uma importante barreira na imunidade de mucosa, os mesmos foram também analisados por citometria de fluxo. Observou-se redução da frequência de linfócitos T $CD3^+ \gamma\delta^+$ com 14 e 60 dias de tratamento quando comparados com o grupo doente (FIG. 19A). Em relação às populações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ observou-se aumento

significativo com 14 dias nos animais tratados com MSC quando comparados àqueles com colite (FIG. 19B e 19C respectivamente, $p < 0,05$).

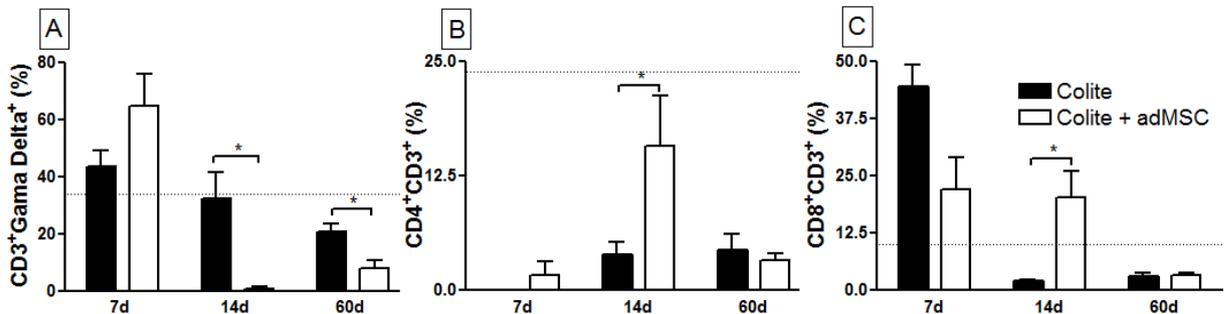


FIGURA 19 - Avaliação da frequência de linfócitos intraepiteliais após indução de colite e/ou tratamento com adMSC. Os linfócitos intraepiteliais (IEL) do cólon dos camundongos foram isolados e marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE), $\gamma\delta$ (FITC), CD4 (PeCy5) ou CD8 (FITC). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células duplo positivas CD3 $\gamma\delta$ (A), CD3CD4 (B) e CD3CD8 (C), foi analisada pelo software FlowJo. * $p < 0,05$. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

4.4.5 Células monocíticas

Ao analisar-se as células monocíticas no compartimento de LP do intestino grosso, linfonodos mesentéricos (LN) e baço (BÇ), verificou-se que houve aumento na frequência de células dendríticas CD11c⁺ aos 14 dias nos camundongos com colite em relação aos tratados (FIG.20B, $p < 0,05$), o que foi observado também no baço (FIG.20C). Porém, embora aos 60 dias a frequência de células CD11c⁺ se apresentasse reduzida em relação aos períodos anteriores, a porcentagem de células marcadas foi significativamente maior no baço dos camundongos tratados com adMSC em relação aos doentes não tratados (FIG. 20C, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças na população CD11c⁺ no infiltrado da LP a despeito do tratamento utilizado (FIG.20A). Na detecção de macrófagos (CD11b⁺) observou-se maior frequência na LP dos animais tratados aos 60 dias (FIG.20D, $p < 0,05$), enquanto que nos LN foi detectada queda na porcentagem de células CD11b⁺ aos 14 dias no grupo tratado em relação ao colite (FIG.20E, $p < 0,05$). Essa redução de macrófagos foi observada também no baço dos camundongos tratados com adMSC aos 14 e, em especial, 60 dias, quando comparados aos animais com colite não tratados (FIG.20F, $p < 0,05$). Além disso, ao avaliar-se a população de células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ foi visualizada diminuição na frequência deste subtipo

celular nos LN e baço dos animais tratados, aos 14 dias (FIG.20H e 20I, respectivamente), além de tendência à redução desta mesma população na LP, também no dia 14 (FIG. 20G).

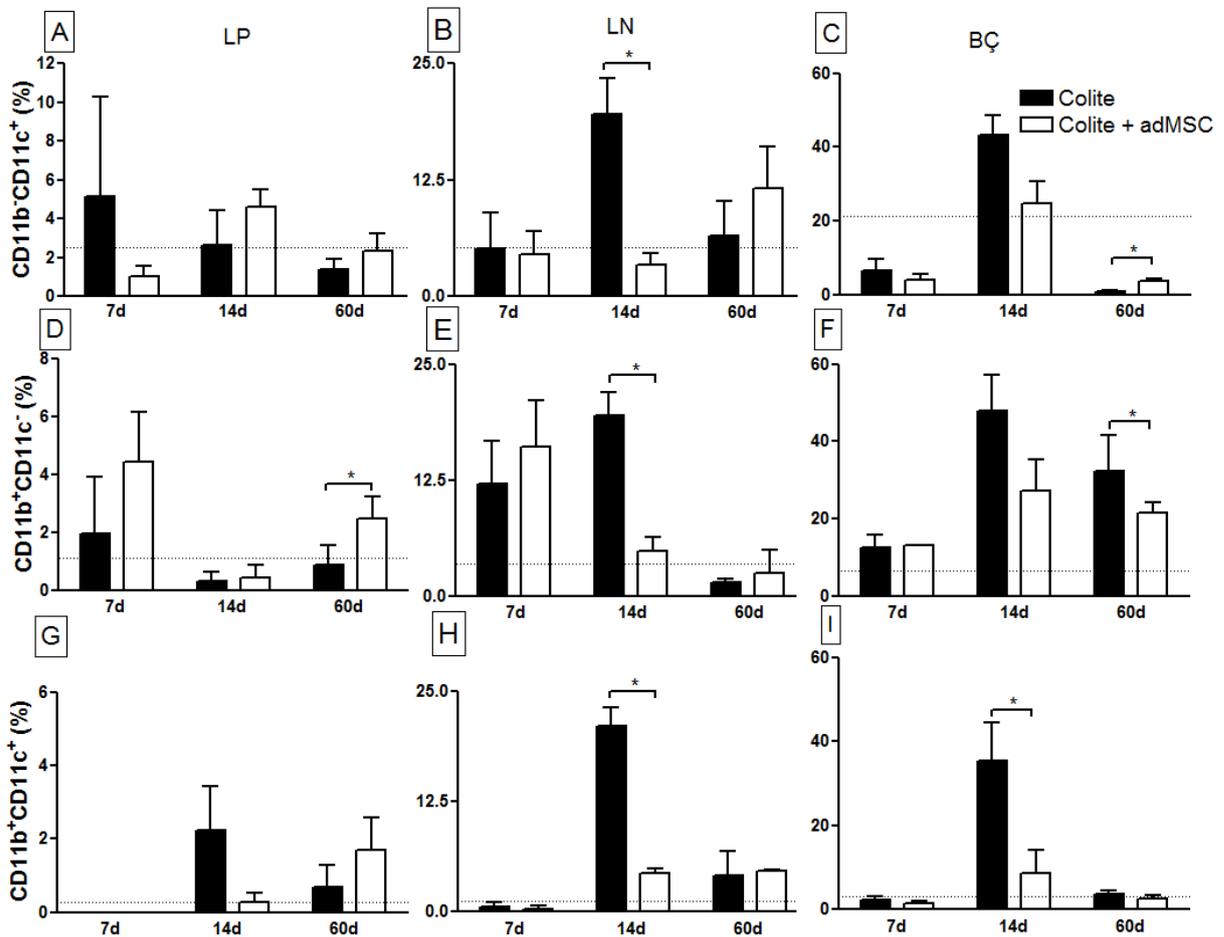


FIGURA 20 - Detecção de células monocíticas nos camundongos após indução de colite e/ou tratamento com adMSC. A lâmina própria (A, D e G), linfonodos mesentéricos (B, E e H) e baço (C, F e I) foram removidos e processados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD11b (PE) e CD11c (FITC). Em A, B e C observamos a porcentagem de células dendríticas (CD11c⁺), em G, H e I células CD11b⁺CD11c⁺ e os macrófagos (CD11b⁺) em D, E e F; após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. A porcentagem de células marcadas dentro da *gate* de monócitos foi analisada pelo software FlowJo. *p < 0,05. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

4.4.6 Células T reguladoras

Sabendo que células T reguladoras são fundamentais no controle de processos inflamatórios e o balanço reguladoras/efetoras define, em geral, o curso de doenças como a DII, buscou-se avaliar a frequência de células CD4⁺ que apresentam alta expressão da cadeia α do receptor de IL-2 (células T reguladoras naturais) na colite, com ou sem tratamento de adMSC. Os linfonodos mesentéricos

(LN) e o baço dos camundongos controles, doentes e tratados, após 7, 14 e 60 dias de infusão de adMSC foram coletados e processados para extração das células mononucleares. Estas, foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 conjugados a fluorocromos e posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

Não houve diferença significativa nos percentuais de células $CD4^+CD25^+$ entre os grupos tratados e doentes, embora tenhamos observado tendência ao aumento no período de 14 no baço dos animais tratados com adMSC (FIG. 21B). Quando analisamos as células $CD4^+CD25^-$ (células T efetoras ou reguladoras induzidas) constatamos aumento significativo nos LN aos 7 dias pós-colite e tratamento com adMSC (FIG.21C, $p < 0,05$).

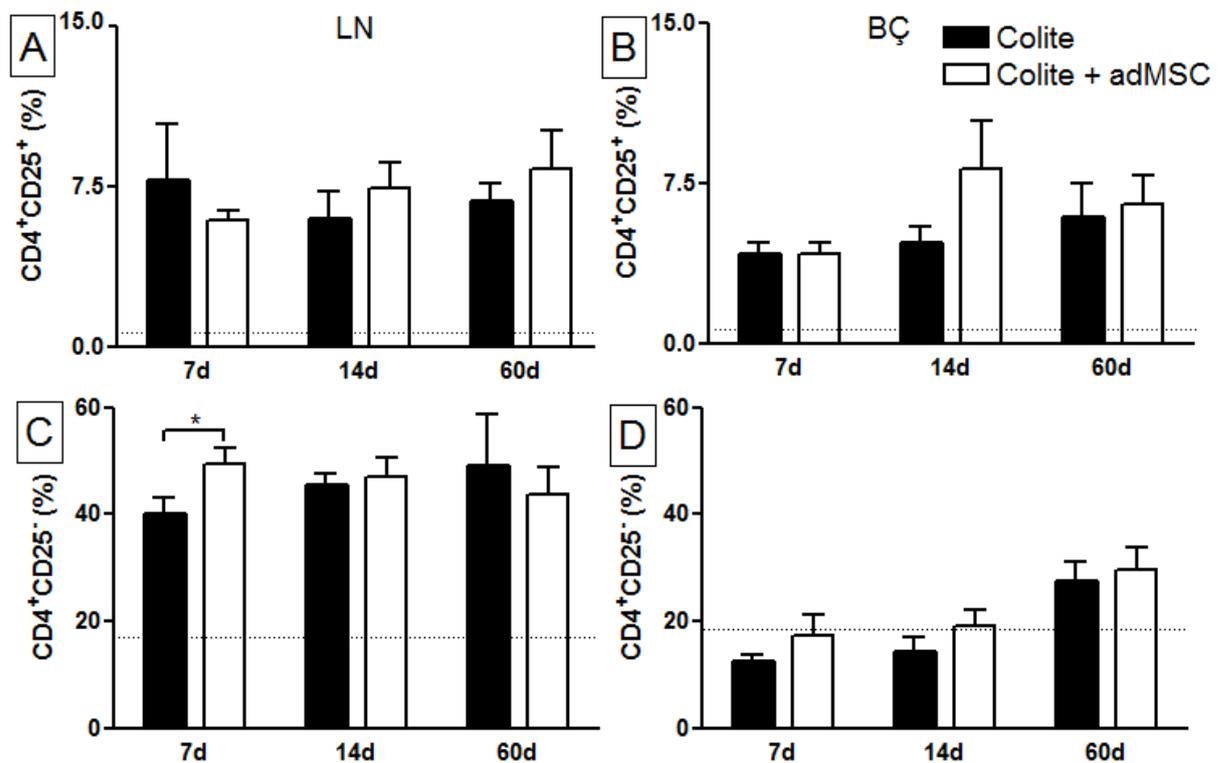


FIGURA 21 - Frequência de células $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^-$ após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. Em (A e C) os linfonodos mesentéricos (LN) e (B e D) baço (BÇ) dos camundongos controles e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para CD4 (PeCy5) e CD25 (FITC). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando $CD4^+CD25^+$ (A e B) ou $CD4^+CD25^-$ (C e D) foi determinada após análise na “gate” de linfócitos, com auxílio do software FlowJo. * $p < 0,05$. Linha tracejada: animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

Porém, com o objetivo de averiguar se as células T $CD4^+CD25^+$ quantificadas poderiam ser de fato reguladoras, buscou-se caracterizá-las com outros marcadores característicos de Tregs nos linfonodos mesentéricos e baço dos camundongos doentes e tratados com MSC.

Primeiramente, avaliamos a expressão de FoxP3⁺ em células CD4⁺CD25⁺. Embora tenhamos observado maior frequência de células CD4⁺CD25⁺ expressando Foxp3 nos LN dos animais colite aos 14 dias, a intensidade média de fluorescência (MFI) dessa molécula foi aparentemente maior no grupo tratado com MSC no mesmo período avaliado (FIG.22A e 22B). Observamos também elevada frequência de linfócitos CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ no baço de camundongos com colite aos 14 dias em comparação aos animais tratados (FIG. 22C, $p < 0,05$), assim como aumento da frequência de células CD4⁺CD25⁻ expressando Foxp3 nos linfonodos dos mesmos animais aos 14 dias (FIG. 22E, $p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças significativas na frequência de expressão tampouco na intensidade média de fluorescência de Foxp3 nos demais momentos ou órgãos avaliados, entre os grupos doentes e tratados.

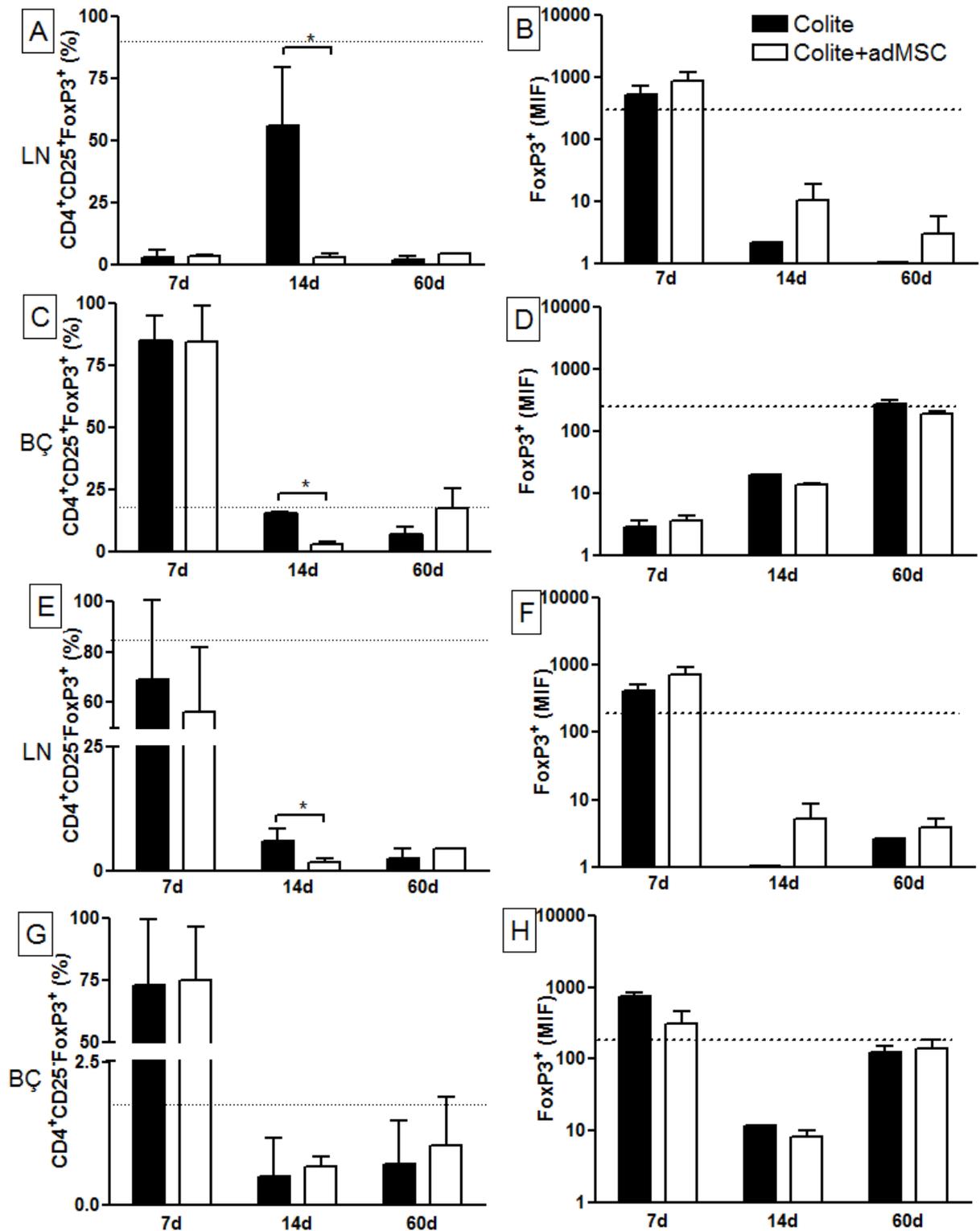


FIGURA 22 - Quantificação de linfócitos T reguladores (FoxP3⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. O baço (Bc) (C, D, G e H) e linfonodos mesentéricos (LN) (A, B, E e F) dos camundongos com colite e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para Foxp3 (PE), CD4 (PeCy5) e CD25 (FITC). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando Foxp3 e a **intensidade média de fluorescência (MIF)** foi analisada dentro da população de células CD4⁺CD25⁺ (A-D) ou CD4⁺CD25⁻ (E-H). *p < 0,05. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

Em relação à frequência de linfócitos T $CD4^+CD25^+PD-1^+$, vimos aumento significativo nos LN 14 dias e baço aos 14 e 60 dias, nos animais tratados com as adMSC em relação ao grupo colite (FIG. 23A e C, respectivamente, $p < 0,05$). Da mesma forma, observamos também MIF de PD-1 aparentemente elevado nas células $CD4^+CD25^+$ dos LN (7, 14 e 60 dias) e baço (60 dias) dos camundongos tratados em relação aos doentes (FIG.23B e D, respectivamente). Em relação aos linfócitos T $CD4^+CD25^-PD-1^+$, observamos significativo aumento com 14 e 60 dias no baço dos animais tratados com adMSC comparados àqueles não tratados (FIG. 23G, $p < 0,05$). Os resultados do MIF para PD-1 nas células $CD4^+CD25^-$ não foram estatisticamente significativos, embora possa ter sido observado aumento aparente de expressão aos 60 dias nos LN e baço dos camundongos tratados com adMSC (FIG. 23F e 23H, respectivamente).

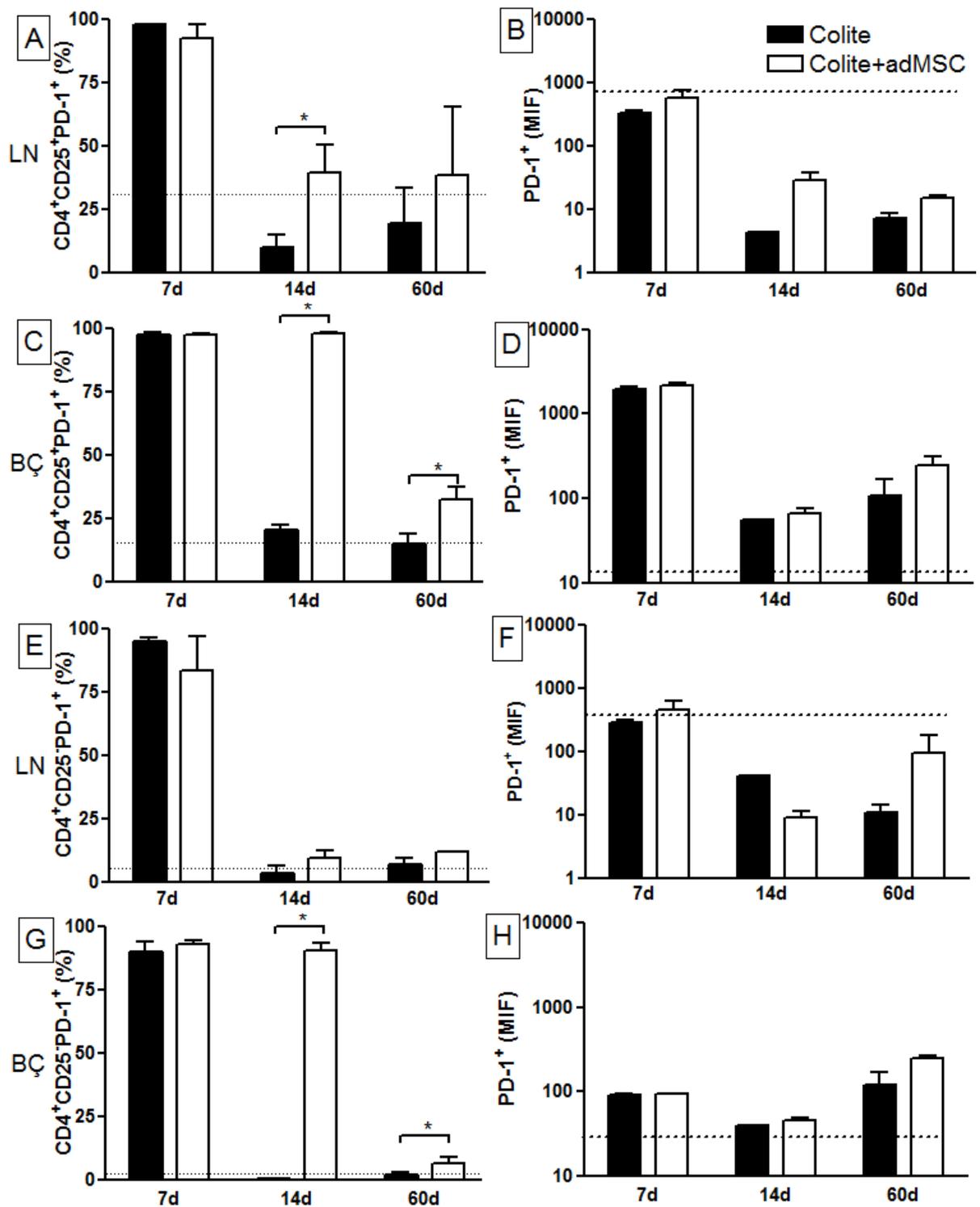


FIGURA 23 - Quantificação de linfócitos T reguladores (PD-1⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. O baço (BÇ) (C, D, G e H) e linfonodos mesentéricos (LN) (A, B, E e F) dos camundongos com colite e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para PD-1 (PE), CD4 (PeCy5) e CD25 (FITC). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando PD-1 e a **intensidade média de fluorescência (MIF)** foi analisada dentro da população de células CD4⁺CD25⁺ (A-D) ou CD4⁺CD25⁻ (E-H). *p < 0,05. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

Ao se comparar os grupos tratados e doentes para caracterização da frequência de linfócitos T $CD4^+CD25^+GITR^+$, observamos significativo aumento com 14 dias nos LN e baço do grupo que recebeu terapia com adMSC (FIG. 24A e 24C, $p < 0,05$). Quanto ao percentual de células $CD4^+CD25^-GITR^+$, ocorreu aumento aparente no baço com 7e 14 dias de tratamento (FIG. 24G, $p < 0,05$) e aumento significativo de MIF nos LN aos 60 dias (FIG. 24F).

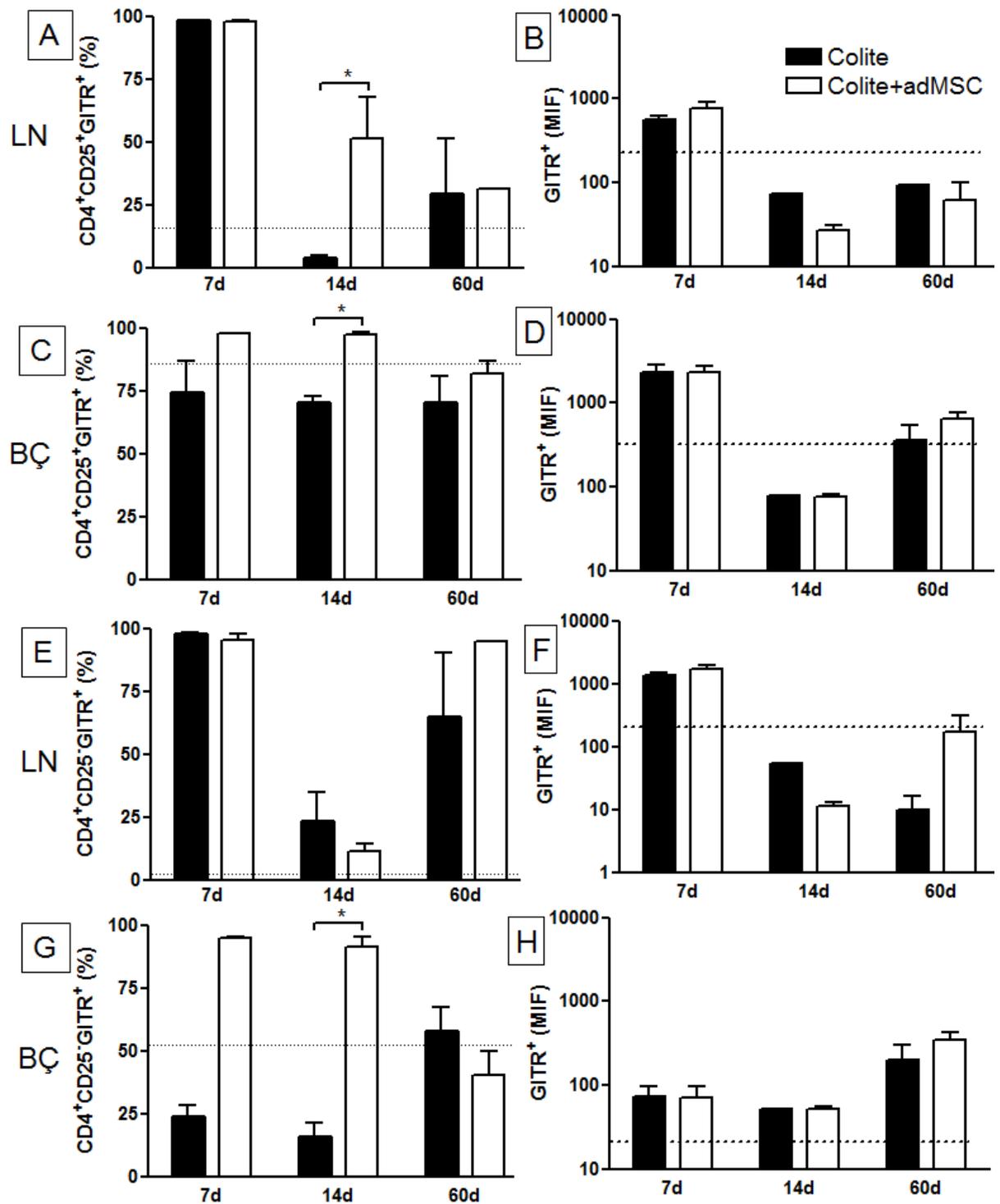


FIGURA 24 - Quantificação de linfócitos T reguladores (GITR⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. O baço (BÇ) (C, D, G e H) e linfonodos mesentéricos (LN) (A, B, E e F) dos camundongos com colite e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para GITR (PE), CD4 (PeCy5) e CD25 (FITC). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando GITR e a **intensidade média de fluorescência (MIF)** foi analisada dentro da população de células CD4⁺CD25⁺ (A-D) ou CD4⁺CD25⁻ (E-H). *p < 0,05. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

Analisando o percentual de linfócitos T $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, encontramos discreta diminuição nos LN com 14 dias, baço com 60 dias e aumento nos LN com 60 dias de tratamento (FIG. 25A e 25C), embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. Para o MIF destas células, verificou-se tendência de aumento nos LN aos 14 dias (FIG. 25B). Já em relação às células com fenótipo $CD4^+CD25^-CTLA-4^+$, observamos pequena diminuição na frequência no baço dos animais tratados aos 60 dias (FIG. 25E) e discreto aumento de MIF nos LN aos 14 dias no grupo tratado (FIG. 25F).

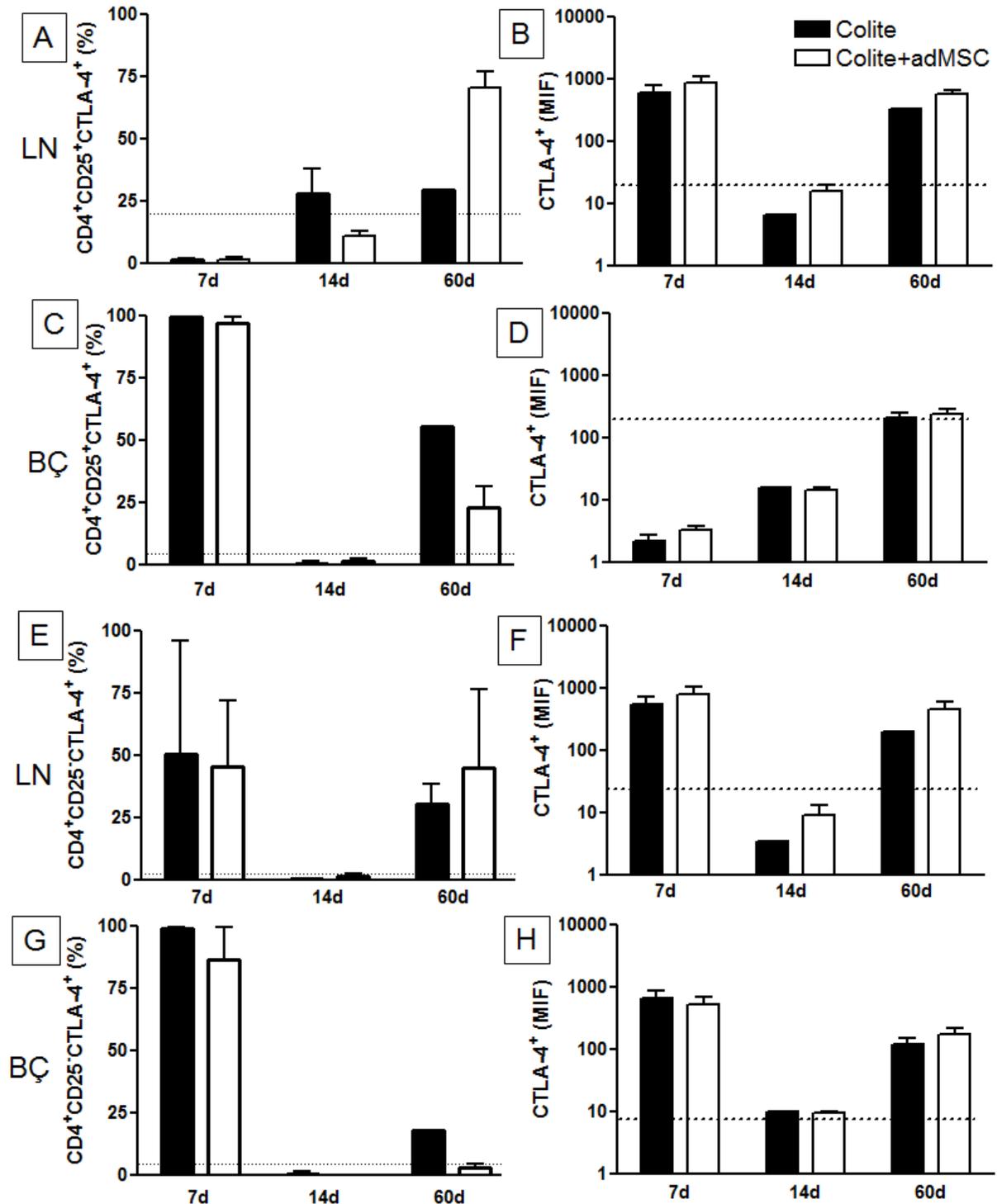


FIGURA 25 - Quantificação de linfócitos T reguladores (CTLA-4⁺) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. O baço (BÇ) (C, D, G e H) e linfonodos mesentéricos (LN) (A, B, E e F) dos camundongos com colite e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para CTLA-4 (PE), CD4 (PeCy5) e CD25 (FITC). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando CTLA-4 e a **intensidade média de fluorescência (MIF)** foi analisada dentro da população de células CD4⁺CD25⁺ (A-D) ou CD4⁺CD25⁻ (E-H). *p < 0,05. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

Por fim, verificamos a frequência dos linfócitos T $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$, e encontramos aumento significativo nos LN e baço de 14 dias nos camundongos que receberam infusão de adMSC (FIG. 26A e 26B, $p < 0,05$). As células T $CD4^+CD25^-CD45RB^{low}$ também estavam significativamente aumentadas nos LN com 14 dias de tratamento e no baço aos 14 e 60 dias, quando comparados com os grupos doentes não tratados (FIG. 26C e 26D, $p < 0,05$).

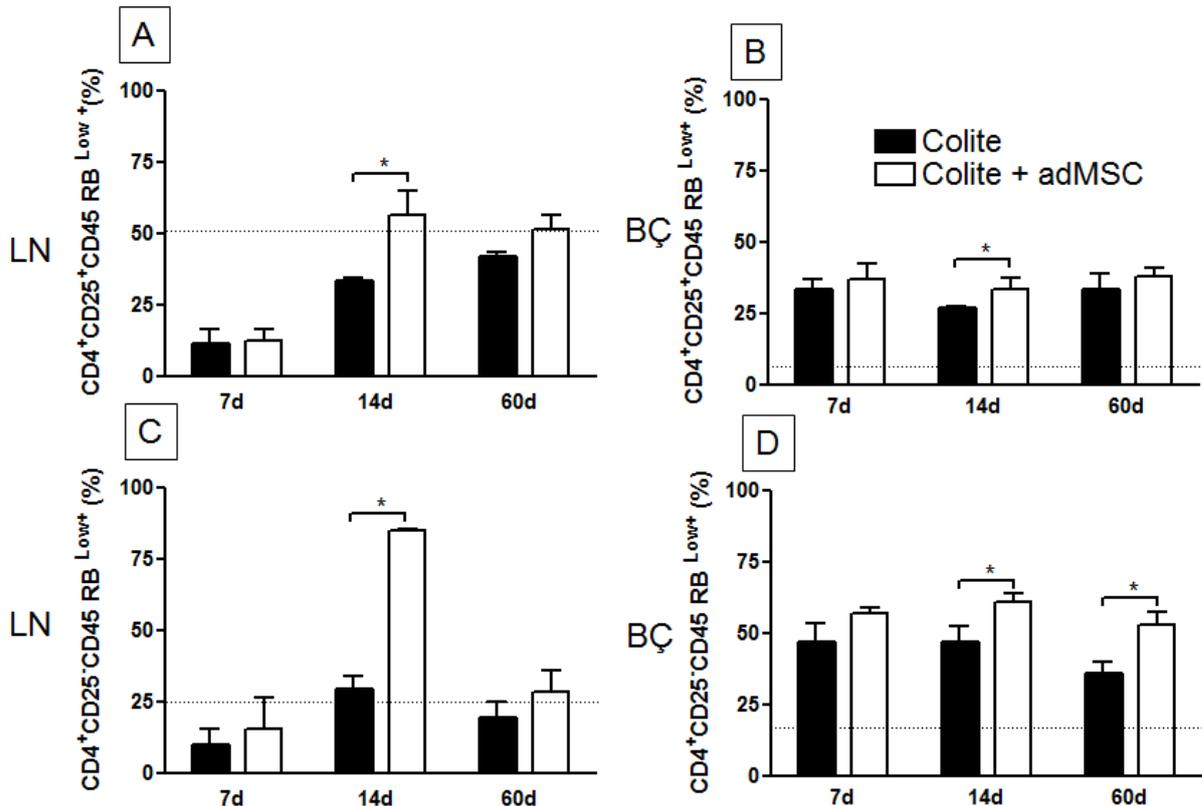


FIGURA 26 - Quantificação de linfócitos T reguladores ($CD45RB^{low}$) após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. O baço (BÇ) (B-D) e linfonodos mesentéricos (LN) (A-C) dos camundongos com a DII e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para $CD45RB$ (PE), $CD4$ (PeCy5) e $CD25$ (FITC). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando $CD45RB$ foi analisada dentro da população de células $CD4^+CD25^+$ ou $CD4^+CD25^-$. * $p < 0,05$. **Linha tracejada:** animais controle etanol (veículo do TNBS) com 14 dias.

4.4.7 Perfil de citocinas

Como a DII é caracterizada por produção descontrolada de citocinas inflamatórias que também desempenham um papel fundamental na destruição do cólon (González, 2009), buscamos quantificá-las nos tecidos intestinais coletados nos vários períodos analisados.

Encontramos aparente redução de IL-2 com 7, 14 e 60 dias nos animais tratados com adMSC em relação ao não tratados (FIG. 27A). A citocina TNF- α mostrou-se com redução significativa aos 3 dias nos camundongos que receberam MSC em comparação àqueles com colite não tratados, embora suas concentrações estivessem discretamente elevadas nos períodos de 7, 14 e 60 dias (FIG. 27B). De forma semelhante, observamos queda significativa nos níveis de IL-6 no dia 3 naqueles camundongos tratados com adMSC em comparação ao grupo colite (FIG. 27C).

Por outro lado, em relação às citocinas do padrão Th2, que supostamente controlariam a inflamação exacerbada da doença, observamos, em geral, aumento nos grupos tratados em relação aos doentes. Em especial, houve elevada produção de IL-4 nos dias 3, 14 e 60 no intestino dos camundongos que receberam infusão de MSC em relação aos doentes não tratados (FIG. 27D). Ainda, observamos altas concentrações de IL-5 nos grupos controles etanol em relação aos demais (dias 3 e 7), além de tendência ao aumento de produção desta citocina nos animais tratados nos dias 3, 7 e 14, em relação àqueles com colite (FIG. 27E). Estes resultados sugerem um possível desvio de resposta para o perfil Th2 no controle da inflamação intestinal, mediado por adMSC.

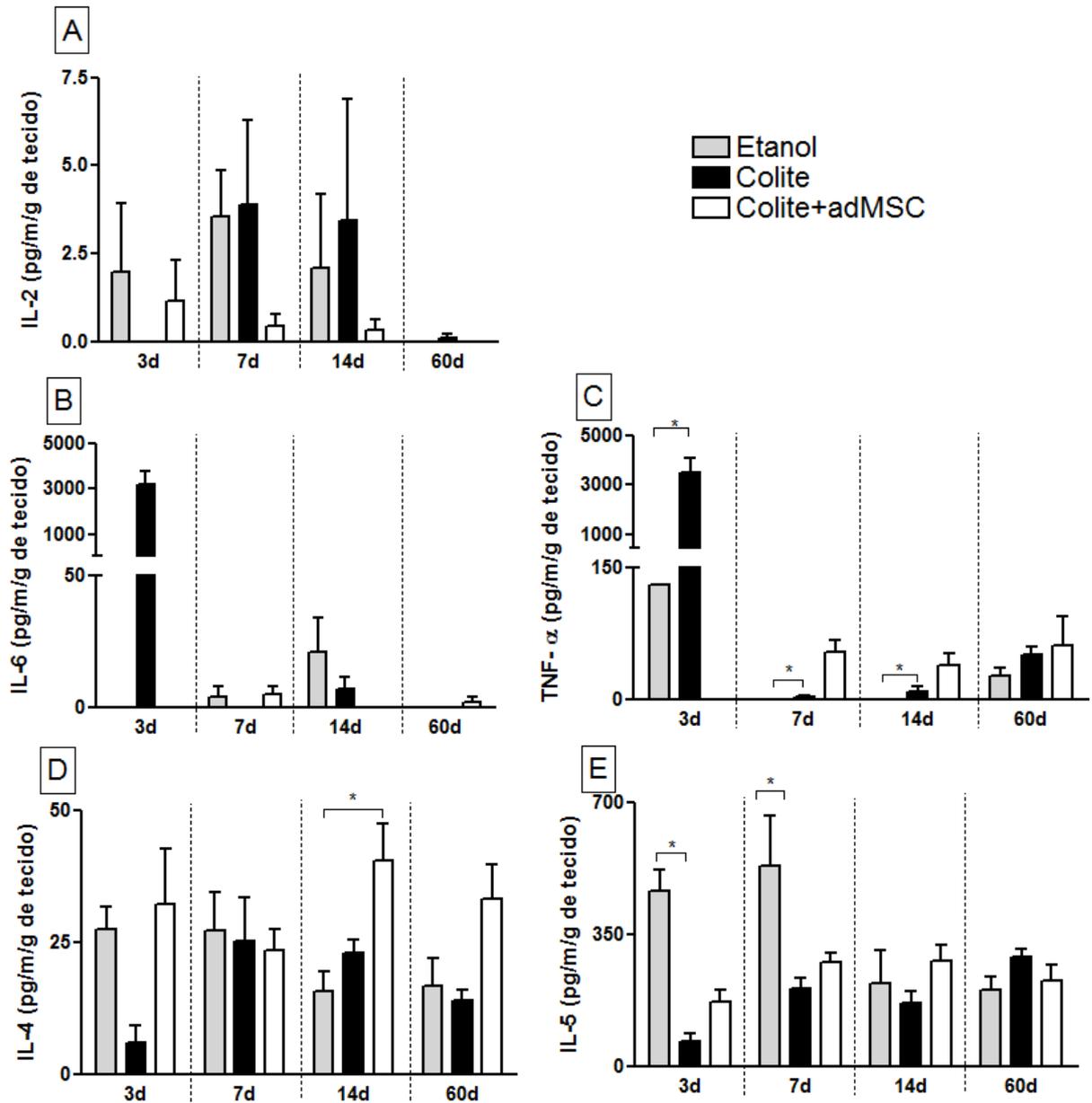


FIGURA 27 - Avaliação do perfil de citocinas no cólon de camundongos com colite e tratados com adMSC. Fragmentos intestinais dos camundongos que receberam etanol, com colite ou tratados foram removidos e triturados em solução contendo inibidores de protease. A presença das citocinas IL-2 (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) foi quantificada por CBA (*Cytometric Bead Array*), em amostras adquiridas em citômetro de fluxo. As citocinas IL-4 (D) e IL-5 (E) foram avaliadas por ELISA, nos diversos tempos pós-colite e tratamento. Os dados foram expressos por pg/ml por grama de tecido. * $p < 0,05$.

4.4.8 Linfócitos Th17

Além da indução de células T reguladoras e modulação das citocinas, buscou-se avaliar o potencial terapêutico das MSC no controle da resposta Th17, sabidamente patogênica na DII. Neste contexto, foram realizadas culturas de células

dos linfonodos mesentéricos de camundongos com etanol, doentes com a DII e tratados com adMSC, com re-estímulo de PMA e ionomicina, para detecção intracelular de IL-17 por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que o aumento de regulação foi acompanhado por uma diminuição da frequência de células T CD4 produtoras de IL-17 (Th17) nos linfonodos mesentéricos em todos os períodos pós-tratamento (FIG. 28, $p < 0,05$) e no baço de camundongos com colite tratados com as adMSC no dia 60 (dados não mostrados).

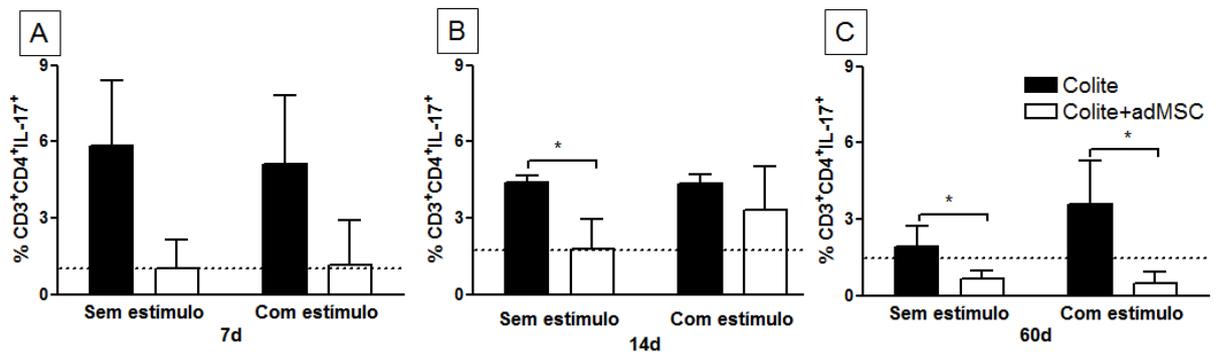


FIGURA 28 - Quantificação de células Th17 dos linfonodos mesentéricos após 7, 14 e 60 dias de indução de colite e/ou tratamento com adMSC. Os linfonodos mesentéricos dos camundongos controles e tratados foram removidos e macerados para extração dos leucócitos, que foram separados por gradiente Ficoll-Hypaque para obtenção das células mononucleares. Após 4h de cultura na presença de forbol-miristato-acetato (PMA), ionomicina e brefeldina, as células foram coletadas, marcadas com anticorpos específicos para CD3 (PE), CD4 (PeCy5) e IL-17 (Alexa 488) para detecção dos linfócitos T CD4 produtores de IL-17, por citometria de fluxo. * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Com o intuito de investigar as alterações imunológicas relacionadas ao transplante das adMSCs, avaliamos os animais doentes na presença ou ausência de tratamento. Foram estudadas as características funcionais dos neutrófilos, eosinófilos, linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$, monócito, células dendríticas, células NK e NKT, linfócitos com o perfil T regulador, células Th17 e a produção de diversas citocinas. Nossos estudos revelaram modulação significativa da resposta inflamatória relacionado com a presença das adMSCs, melhorando em geral o estado clínico dos animais que foram tratados.

Como já descrito na literatura, alguns dos antígenos mais importantes para caracterização das MSCs são o CD90 (conhecido como Thy-1), CD73 (ecto-5'-Nucleotidase) e CD105 (endogлина), em alta expressão. Além disso, observa-se nessas células ausência de marcadores hematopoéticos como CD45 (marcador pan-leucocitário), CD34 (antígeno que caracteriza células progenitoras hematopoiéticas), CD14/CD11b (expressos em monócitos e macrófagos), ausência de moléculas HLA-DR, CD79a e CD19 (células B), além da baixa expressão de CD31, encontrado em células endoteliais (Zhang et al., 2005; Dominici et al., 2006). A expressão de CD13 (aminopeptidase N) e CD166 (molécula de adesão celular) também caracteriza as MSCs (Haack-Sorensen, 2008). Assim sendo, dentro deste contexto, nossas culturas de adMSCs apresentaram os critérios que permitiram as definir como de fato células mesenquimais estromais, com capacidade de aderência ao plástico, expressão positiva dos antígenos CD90, CD73 e CD13, expressão intermediária de CD166 e baixa expressão de CD45, CD14, CD31, CD34. Além disso, testamos o potencial supressor e a plasticidade *in vitro* das adMSCs e demonstramos que estas conseguiram suprimir a proliferação alogeneica de PBMC e diferenciar-se em osteoblastos e adipócitos. Estes resultados comprovaram a sua multipotencialidade e validaram os ensaios subseqüentes que envolviam reparo tecidual e imunorregulação. Embora as adMSC tenham apresentado esta multipotencialidade, sabe-se que MSCs de outra origem, como aquelas isoladas de sangue de cordão umbilical, não apresentam a capacidade de diferenciação em adipócitos, mas em apenas duas linhagens mesodérmicas (Kern et al., 2006, Meirelles et al., 2003. e Dominici M et al., 2006).

A utilização de MSCs no tratamento de doenças autoimunes foi demonstrada pela primeira vez na encefalomielite autoimune experimental (EAE). Posteriormente, diversos estudos pré-clínicos forneceram evidências que justificaram a eficiência da terapia. Por exemplo, em modelo de artrite, a administração de MSCs diminuiu a proliferação de células T antígeno-específicas e citocinas pró-inflamatórias (Augello, 2007, Gonzalez, 2009). Em outros exemplos, a administração de MSCs em modelos experimentais melhorou a enteropatia autoimune (Parekkadan, 2008), diabetes tipo 1 (Fiorina, 2009, Lee, 2006) e nefrite causada pelo lupus (Gu, 2010). Vale ressaltar que, embora o modelo experimental dessas doenças envolva mecanismos patogênicos diferentes, a administração de MSCs exógenas para tratamento produziu efeitos similares aos observados na EAE, inibindo a resposta autoimune periférica com diminuição da infiltração de células T e macrófagos, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e melhora local com reparação tecidual (Zhang, 2005).

No presente trabalho observamos que as MSC apresentaram potencial curativo na DII, como observado pelo ganho de peso, melhora do *score* clínico da doença e ausência de encurtamento intestinal. Na análise histológica dos cólons observamos maior frequência de aparecimento de áreas de re-epitelização assim como reparo mais precoce. A presença de fibroblastos jovens nestas áreas já no início do tratamento, demonstrou a tentativa de reparo nestes animais que receberam MSC, já que uma das funções dos fibroblastos é a síntese de proteínas envolvidas na regeneração tecidual. Estes resultados sugeriram que as MSC podem estar envolvidas no reparo tecidual do cólon inflamado. De fato, trabalhos anteriores mostraram que o tratamento com MSCs é altamente eficaz para a colite e uma única injeção sistêmica melhorou os sinais clínicos e histopatológicos da doença, além de ter reduzido a alta mortalidade causada pela DII (Gonzalez-Rey, 2009, Liang, 2010). Outro trabalho que avaliou a DII tratada com adMSCs teve resultados condizentes com os nossos, mostrando que após o tratamento houve aumento da taxa de sobrevivência, perda de peso rapidamente recuperada assim como a aparência saudável dos camundongos que receberam MSC. As análises histológicas dos cólons mostraram que o tratamento com as adMSCs reduziu inflamação transmural causada pela DII induzida por TNBS (González et. al., 2009), o que também corrobora com os nossos achados. Em adição, *Ciccocioppo* e colaboradores avaliaram, recentemente, pacientes com doença de Crohn fistulizante após o

transplante autólogo de MSCs isoladas de medula óssea. Obtiveram resultados satisfatórios na maioria dos casos, com o fechamento completo das fístulas, apresentando redução paralela da doença de Crohn e índices de atividade da doença perianal. Além disso, o tratamento não apresentou nenhum efeito adverso (Ciccocioppo, 2011). Porém, nenhum destes trabalhos avaliou os parâmetros específicos de modulação local da resposta imunológica como visto no presente estudo.

Por apresentarem expressão consideravelmente baixa de MHC de classe II, as adMSCs são células com fenótipo não-imunogênico ou hipo-imunogênico, não sendo reconhecidas por células T (Tse, 2003) e, portanto, permitindo o seu transplante xenogênico. De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, aparentemente as células transplantadas não induziram *per se*, respostas de rejeição e sim cicatrização da área afetada pela colite, como visto pelas análises clínicas, microscópicas e imunológicas dos animais e tecidos coletados. Entretanto, outros trabalhos demonstraram que as MSCs não são intrinsecamente imunoprivilegiadas, sendo capazes de induzir células T de memória após transplante das MSCs (Eliopoulos, 2005; Alma; Moadsiri, 2006). Ainda, González-Rey et al., demonstraram que o efeito benéfico das adMSC na DII não se restringiu a um sistema xenogênico, mas também ocorreu em transplante singeneico e alogênico, melhorando a colite (González-Rey; González, 2009). Estes resultados também foram vistos no transplante de MSCs extraídas do cordão umbilical, no tratamento da DII (Liang, 2010), embora em nenhum destes trabalhos certos mecanismos específicos de ação das MSC tenham sido esclarecidos, como no presente trabalho.

Como as MSCs podem suprimir a ativação de células *in vivo*, este pode ser um caminho para que o organismo mantenha a homeostase, inibindo a ativação do sistema imune em compartimentos distintos, como a medula óssea e a interface materno-fetal. Portanto, as MSCs podem modular a função imunológica das principais células envolvidas no reconhecimento de aloantígenos, como células apresentadoras de antígenos, as células T e células natural killer. No entanto, o mecanismo molecular que medeia este efeito imunossupressor das MSC ainda não é completamente compreendido (Rasmusson, 2006; Casiraghi, 2008). O resultado final da interação entre MSCs e células imuno-competentes é provavelmente influenciado pelo microambiente local, que inclui a presença de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e sinais patogênicos (Uccelli et al., 2008). Neste

contexto, nossos ensaios para avaliar a capacidade anti-proliferativa das adMSCs, corroboraram com os dados já existentes, mostrando inibição da proliferação de PBMCs contato-dependente (Uccelli et. al., 2008). O papel exato pelo qual ambos mecanismos (fatores solúveis ou supressão contato-dependente), suprimem a respostas das células T ainda é uma questão não totalmente esclarecida. Porém, sabe-se que a imunossupressão por MSC humana pode ser mediada por fator de crescimento dos hepatócitos, TGF- β 1 (DI, 2002), PGE2 (Aggarwal, 2005), indoleamina 2, 3 dioxigenase (IDO) (Meisel, 2004), e óxido nítrico (Sato, 2007).

A Doença de Crohn é caracterizada por falhas nos processos de imunorregulação e supressão, com respostas dos linfócitos T helper (Th) 1, que promovem ativação exagerada de macrófagos e infiltração de neutrófilos, dando origem a uma grave e prolongada inflamação transmural da mucosa intestinal, caracterizada pela produção descontrolada de citocinas inflamatórias, mediadores químicos e radicais livres. Estes, são produzidos pelo infiltrado inflamatório e por macrófagos residentes, que desempenham um papel crítico na destruição dos tecidos do cólon (Bouma, 2003, González et. al., 2009, Schirbel e Fiocchi, 2010). Neste sentido, quando analisamos o infiltrado inflamatório de neutrófilos por MPO e sua relação com o tratamento com as adMSC observamos que estas células estavam diretamente relacionadas à inflamação na mucosa intestinal, corroborando com os estudos prévios já publicados, que demonstraram acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório e sua redução após tratamento com MSC (González et al, 2009, Gonzalez-Rey et al, 2009). Em adição à redução de MPO, o aumento dos níveis de EPO após o tratamento com MSC sugeriu que esta nova terapia consegue interferir no acúmulo de neutrófilos e eosinófilos no sítio da doença, levando a uma possível inversão de resposta imunológica para um perfil Th2. A diferenciação para esse subtipo de linfócito CD4⁺ requer sinalização mediada por IL-4, a qual eleva sua própria produção e a de outras citocinas, como IL-5, responsável pela geração de eosinófilos (Zhu, 2010). Assim, para ativação de um linfócito Th2 é necessária a supressão de outros destinos, como a inibição da expressão de STAT4 ou T-bet, que levariam à diferenciação para Th1. Este perfil de resposta, além do Th17, seriam responsáveis pela inflamação exacerbada na mucosa intestinal no modelo utilizado. Neste sentido, o recrutamento de eosinófilos pode estar diretamente relacionado à regressão da DII.

Além de granulócitos, sabemos que a DII é também caracterizada por infiltração de células mononucleares que corroboram com a destruição da mucosa inflamada. Neste contexto, a quantificação geral do infiltrado inflamatório nos animais tratados demonstrou um papel para as MSC na redução de linfócitos no cólon (LP e IEL), sugerindo que este tratamento poderia intervir no recrutamento e/ou acúmulo dessas células no intestino. Linfócitos intraepiteliais intestinais (IEL) são uma população heterogênea de linfócitos localizados entre as células do epitélio intestinal e responsáveis pelo monitoramento da integridade do epitélio. Neste compartimento intraepitelial há presença de grande quantidade de células T gama-delta e outros linfócitos como T CD4 e, principalmente, TCD8 os quais, em nosso trabalho, poderiam estar exercendo função protetora na reconstituição do epitélio intestinal pós-tratamento (Jabri, 2007). Já a LP consiste de células B (15-40%), células T (40-90%) e um número limitado de células natural killer.

O segundo importante subtipo de leucócitos na LP é a linhagem de monócitos / macrófagos, presentes no cólon difusamente. Eles são um grupo heterogêneo composto de células com propriedades fagocíticas ou especializadas na apresentação de antígenos (Geboes, 2003). De forma geral, o tratamento da inflamação intestinal com MSC levou também à redução do acúmulo de macrófagos e células dendríticas na mucosa intestinal e tecidos associados, o que corrobora com o papel anti-inflamatório dessa população de células estromais. Os macrófagos intestinais normais são condicionados pelo microambiente da mucosa para expressar um fenótipo não-inflamatório, produzindo baixa expressão de receptores para a imunidade inata e a produção limitada de citocinas pró-inflamatórias (Smith, 2005). Em contraste, na DII os macrófagos afetados da mucosa exibem um fenótipo ativado e são fenotipicamente heterogêneos. Os macrófagos que expressam CD14, recrutados a partir do sangue periférico, podem produzir várias citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 α , IL1- β e TNF- α , IL-23 e IFN- γ , as quais auxiliam na ativação de células T no local da inflamação (Rugtveit,1994, Rugtveit, 1997). De forma similar, as células dendríticas intestinais são células apresentadoras de antígenos envolvidas na iniciação e regulação dos fenômenos imunológicos inatos no local, mas também tem um papel na resposta imune adaptativa (Rescigno, 2009). Como macrófagos, sua função é modulada pelo microambiente da mucosa, podendo funcionar na proteção e defesa, induzir tolerância ou mediar inflamação (Bilsborough, 2004). Na DII, as células dendríticas são ativadas, sua expressão de

receptores microbianos é reforçada, e produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6 (Hart, 2005). Neste contexto, a diminuição das células monocíticas na LP, baço e linfonodos mesentéricos pós-infusão de MSC pode ter contribuído para melhora da inflamação intestinal em questão.

Quando averiguamos as populações nos LN e baço, observamos discreto aumento de células CD3⁺ em todos os períodos nos animais tratados, o que indica uma possível participação de linfócitos T nesta resposta. Dentre as células CD3⁺, o acúmulo diferencial dos linfócitos NKT CD3⁺CD49b⁺ e, além disso, de células *natural killer* CD3⁺CD49b⁺ nos LN e baço, sugeriu uma possível modulação da resposta imune de mucosa dependente destas células após a infusão de MSC. As células NKT podem produzir, após ativação do TCR, várias citocinas com papéis importantes na imunidade da mucosa (Middendorp, Nieuwenhuis, 2009), maturação e ativação de células dendríticas (Hermans, Silk, Gileadi, 2003). As células NKT foram avaliadas em vários modelos experimentais da DII, sendo que a transferência combinada de células T CD4 patogênicas com células NKT leva a melhora da doença (Hornung, Farkas, Sattler et. al., 2006). Por outro lado, as células NK são importantes células efetoras da resposta imune inata, requeridas para a primeira linha de defesa contra células transformadas e infectadas, exercendo importante papel na interligação das respostas imunes inata e adaptativa, por meio da secreção de IFN- γ (Martín-Fontecha et al., 2004). Outro trabalho também mostrou que a infusão de MSCs pode melhorar o enxerto de células hematopoiéticas na leucemia mielóide aguda, fornecendo apoio estromal adequado e interagindo com as células transplantadas. Além disso, o efeito benéfico da MSCs também reflete sua capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T do doador e de prejudicar a função das células dendríticas residuais do paciente. Através do bloqueio de células T do paciente, as MSCs pode evitar a rejeição do transplante hematopoiético inibindo células NK e induzindo um ambiente apropriado para o processo de cura. Embora todas essas ações das MSC possam resultar em um transplante bem sucedido, dois efeitos podem ocorrer. Primeiro, as células NK podem matar MSCs (que expressam baixos níveis de MHC classe I) e transportar ligantes para a ativação de receptores NK. Segundo, MSCs podem inibir a proliferação de células NK e funções efetoras, incluindo a citotoxicidade e produção citocinas (Uccelli, et. al., 2008)

O aumento relativo de células T poderia, também, ser explicado com base na maior freqüência de células TCD4 nos LN e baço dos animais tratados com MSC,

embora não se saiba, ao certo, se esta população é reflexo de maior acúmulo de linfócitos efetores ou reguladores. No entanto, o menor acúmulo de células T CD8 nos linfonodos mesentéricos 14 dias após infusão de MSC poderia ser indicativo da redução de uma população potencialmente patogênica e inflamatória na DII. Estes resultados corroboram parcialmente com trabalho publicado anteriormente, o qual demonstrou que o tratamento de DII experimental com transplante de medula óssea associada a imunossupressão, gera redução acentuada de células CD4⁺ e CD8⁺ no cólon, fato que provavelmente contribuiu para a melhora da inflamação intestinal e regressão da doença, neste caso (Godoi, 2008).

As células T CD4⁺CD25⁺ são potenciais reguladoras da resposta imune-inflamatória nas DII. Estudos mostram que a regulação do desenvolvimento da inflamação intestinal é dependente da presença e função de células T reguladoras no intestino, que podem agir inibindo respostas inflamatórias excessivas, como Th1 e, supostamente, Th17 (Yu et al., 2007). Nossos resultados demonstraram tendência de aumento das células CD4⁺CD25⁺ (reguladoras naturais) e CD4⁺CD25⁻, assim como a maioria dos marcadores de Tregs nessas populações, após o tratamento com MSC, sugerindo que o transplante xenogênico de MSC pode controlar a inflamação intestinal por meio da indução de células T reguladoras. Sabe-se que as MSCs são capazes de realizar imunorregulação de processos inflamatórios e que a presença de MSCs humanas em cultura mista de linfócitos (MLR) favorece a diferenciação de subpopulações de células T CD4⁺ que expressam um fenótipo regulador/supressor (CD4⁺CD25⁺) (Casiraghi, Selmani, 2008, Batten, 2006, Aggarwal, 2005, Maccario, 2005, Di Ianni, 2008).

Por outro lado, o papel de Treg na imunomodulação induzida pelas MSCs é controversa. Há dados que demonstram que a inibição mediada pelas MSCs no sistema imunológico humano não é revertida pela remoção de Treg na co-cultura (Krampera, 2003). Com isso, um dos mecanismos mais importantes que as MSCs suprimem as respostas imunes é através da indução de células T reguladoras (Tregs) (Nauta e Fibbe, 2007). Ainda, o aumento do número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em órgãos linfóides e no enxerto de animais a longo prazo indica que as MSC são capazes de iniciar um processo ativo tolerogênico. Este, supostamente se sustenta através da interação com a população residente de células T, favorecendo a geração de Tregs CD4⁺CD25⁺ (Casiraghi, 2008). Tendo em vista estes e outros estudos anteriores (González 2009, González-Rey, 2009), os

dados encontrados em nosso trabalho nos permitem supor que, embora não tenhamos observado alta expressão de FoxP3 nos camundongos tratados com MSC, os demais marcadores de Tregs corroboram com a hipótese de que as MSC infundidas podem ter gerado imunorregulação e controle da resposta intestinal nos animais com DII.

As células T reguladoras também podem expressar outras moléculas fenotípicas, incluindo CD45RB^{low} (Lee, 1990), CTLA-4 (Read, 2000, Kingsley, 2002), PD-1 (Augello, 2005, Sharma, 2007), GITR (McHugh, 2002) entre outras. Há evidências crescentes de que essas células T com função reguladora desempenham papel central no controle da reatividade a auto-antígenos e respostas aloimunes (Cassis, 2005).

As Tregs se utilizam de vários mecanismos para exercerem suas funções reguladoras. Um destes mecanismos é através da estimulação da expressão de PD-L em células dendríticas e outras células, que ao se ligarem em PD-1 expresso em células T efectoras induzem a apoptose (Augello, 2005, Sharma, 2007). Também foi visto em camundongos, que células T CD4⁺ naïve expressam altos níveis de CD45RB, enquanto que células T CD4⁺ que já encontraram antígenos expressam baixos níveis de CD45RB (Lee, 1990). A análise funcional do CD45RB^{hi} e CD45RB^{low} em células T CD4⁺ demonstrou que ocorrem importantes interações reguladoras entre esses subgrupos *in vivo*, com atividade reguladoras sendo principalmente na população CD4⁺ CD45RB^{low} (Hara, 2001, Powrie, 1993, Davies, 1999).

Através do contato células a células, as Tregs ativadas provocam diminuição da expressão de CD80 e CD86 nas APCs, o que pode estimular as células dendríticas a expressarem a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que cliva o triptofano levando à formação de produtos tóxicos no citoplasma da célula, e consequente diminuição da proliferação de células T. As MSCs também estão envolvidas nessa modulação da resposta imunológica interagindo com a IDO (Aggarwal e Pittenger, 2005). Este processo parece ser dependente do antígeno de linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA4, CD152) que é expresso constitutivamente em células T reguladoras (Cardoso, 2008, Read, Takahashi, 2000). O CTLA4 parece estar funcionalmente associado com as células Tregs, mas sua expressão não é específica para essa população de células (Linsley, 1991, Engen, 2002).

O GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) é expresso pelas células Tregs após a exposição a aloantígenos (Zelenika, 2002), bem como ocorre expressão constitutiva em células reguladoras (McHugh, Shimizu, 2002). Vários trabalhos tem sido descritos sobre a interação dessas moléculas de superfície como fatores importantes na modulação da resposta inflamatória em diversas doenças autoimunes, como a expressão de CTLA-4 e PD-1 na artrite reumatóide (Singer, 2011). Neste contexto, o aumento das células T no baço e linfonodos mesentéricos pós-infusão de MSC com um perfil regulador CD4⁺CD25⁺ e CD4⁻CD25⁺ pode ter contribuído para melhora da inflamação intestinal em questão.

Porém, para avaliar mais precisamente a modulação da resposta imune intestinal, fez-se necessária a quantificação das citocinas produzidas no cólon, na presença e ausência de tratamento com MSC. Os resultados mostraram, em geral, regulação da resposta inflamatória e conversão para resposta imune do padrão Th2, a qual supostamente auxiliou no controle da doença. Estes efeitos foram mais evidentes nos primeiros dias pós-tratamento, quando observamos maior redução de TNF- α e IL-6 com aumento de IL-4 e IL-5 nos animais tratados com MSC. Estes resultados corroboraram parcialmente com aqueles encontrados por González et al, 2009, que observaram redução dos níveis de TNF- α após tratamento de colite experimental com MSC humanas. Ao contrário, Godoi et al 2008 não observaram aumento significativo de IL-4 pós-tratamento de DII induzida por TNBS com imunossupressão e transplante de células totais de medula óssea. Por outro lado, observamos também discreto aumento de TNF- α nos dias 7 e 14, o que poderia estar relacionado a alguma resposta xenogênia às MSCs humanas.

Conforme exposto anteriormente, as células T pró-inflamatórias e as citocinas por elas produzidas são os principais efetores na indução e perpetuação da inflamação intestinal na DII (Bouma, Strober, 2003, Colombel, Watson, Neurath, 2008). Sabendo que recentemente foi descrita a participação de células T produtoras de IL-17 na DII, buscamos caracterizar esta população Th17 nos camundongos doentes e com colite tratados com MSC. Os dados obtidos indicaram, pela primeira vez, uma importante participação das MSC na redução do padrão de resposta Th17, potencialmente patogênico no modelo de inflamação utilizado. Na colite induzida por TNBS a IL-17 é pró-inflamatória e participa do dano tecidual na mucosa intestinal (Zhan, 2006). Nossos dados estão de acordo com Godoi et al, 2008, que observaram redução dos níveis de IL-17 após imunossupressão e

transplante de medula óssea para tratamento de colite induzida por TNBS, sugerindo que, de fato, a IL-17, neste modelo de DII, é patogênica, e sua produção pode ser regulada por tratamentos imunossupressores como a ciclofosfamida ou terapia celular com MSC. As células Th17 e IL-17 têm sido encontradas em níveis elevados no soro e no tecido intestinal de pacientes com a DII, corroborando com a hipótese da participação dessas células no desenvolvimento da doença (Kobayashi, Okamoto, Hisamatsu et al., 2008). No presente trabalho, a redução de Th17 foi concomitante à diminuição do acúmulo de neutrófilos no cólon dos camundongos doentes tratados com MSC, o que está de acordo com estudos anteriores, os quais mostraram que, além de indução de inflamação, a IL-17 promove o recrutamento de células mononucleares e neutrófilos para tecidos periféricos (Elson, Cong, Schoeb et al., 2007), (Shen, Scott, Durum, 2010), amplificando ainda mais a inflamação local e o combate a bactérias extracelulares. As células humanas Th17 na DII também podem expressar IFN- γ bem como IL-23R e IL-12R β 2 (Th17/Th1). Além disso, IL-12 pode diminuir a expressão de ROR γ t e IL-17, enquanto aumenta expressão de T-bet (Annunziato, 2007), levando a inibição de células Th17 pelo IFN- γ (Weaver, 2007). Ainda, estudos relataram que tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17 agravou a colite induzida por DSS (dextran sulfato de sódio) em camundongos (Ogawa, Andoh, Araki et al., 2004). Também há o papel da IL-23 em desempenhar bloqueio na função das Treg, sugerindo que células derivadas do sistema imune inato que sintetizam IL-23 podem promover colite não só pela indução da produção de IL-17, mas por inibição da função das células Treg (FoxP3⁺) (Izcue, 2008; MALOY, 2003).

Concluindo, nossos resultados contribuem para os achados sobre a utilização das MSCs na modulação de doenças inflamatórias e autoimunes. As MSCs são de suma importância para a regulação das respostas que poderiam levar à produção exagerada de mediadores inflamatórios causadores da DII. O tratamento de camundongos com DII induzida experimentalmente demonstrou o potencial terapêutico de MSC xenogênicas no controle das respostas desreguladas de mucosa intestinal, culminando com a visível melhora clínica dos animais tratados. Finalmente, estes resultados abrem novas perspectivas de tratamentos mais efetivos para doenças de difícil controle como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa, tendo por base a terapia celular com MSC humanas.

6. CONCLUSÕES

- 6.1 As MSCs provenientes de tecido adiposo apresentam marcadores de superfície, plasticidade e potencial supressor semelhantes às populações de MSC já previamente isoladas de outros tecidos.
- 6.2 As AdMSC são capazes de controlar a inflamação intestinal e os sinais clínicos da DII induzida experimentalmente em camundongos.
- 6.3 O infiltrado inflamatório na DII é influenciado pelo tratamento com MSC, o qual diminui o acúmulo de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas no cólon, baço e linfonodos mesentéricos com modulação das populações de células NK/NKT e linfócitos T, além de levar ao aumento de eosinófilos no intestino.
- 6.4 O tratamento da DII com MSC induz inversão do padrão de resposta imune intestinal, com redução de citocinas inflamatórias, diminuição da população de células Th17, aumento de regulação (Tregs) e resposta Th2.

REFERÊNCIAS

- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007 8(9): 942-9.
- Aggarwal S e Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005, 105(4): 1815-22.
- Aichbichler BW, Petritsch W, et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1999 44(4): 852-6.
- Alma J N, Geert W, Alwine B K, Ellie G A, Lurvink RW, Willem E. Fibbe Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006 108: 2114-2120
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med*. 2007 204:1849–61
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 35(5): 1482-90.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G: Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56:1175-1186.
- Baecher-Allan C, Viglietta V, et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004 16(2): 89-98.
- Barry FP, Murphy JM, English K, et al. Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. *Stem Cells Dev*. 2005;14:252–265.
- Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, Yacoub MH. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell alloresponses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng*. 2006 12: 2263–2273.
- Betelli E, Carrier Y, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 441(7090): 235-8.
- Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology*. 2004 127: 300–9.

Bouma G e Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 3(7): 521-33.

Brittan M, Alison MR, et al. Bone marrow stem cell-mediated regeneration in IBD: where do we go from here? *Gastroenterology*. 2007132(3): 1171-3.

Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi, MA e Silva JS. Characterization of CD4_CD25_ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008 84: 311-8.

Cassis L, Aiello S, Noris M. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Contrib. Nephrol*. 2005 146: 121–131.

Cavinato RA, Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Cugini D, Mister M, Pezzotta A, Aiello S, Remuzzi G, Noris M. Pretransplant donor peripheral blood mononuclear cells infusion induces transplantation tolerance by generating regulatory T cells. *Transplantation*. 2005 79: 1034–1039.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 25:2739–2749.

Chen W, Jin W, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 198(12): 1875-86.

Cho HH, Bae YC, Jung JS. Role of Toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2006 24:2744–2752.

Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, et.al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Inflammatory bowel disease*. 2011 788 -798

Colombel JF, Watson AJ, Neurath MF. The 10 remaining mysteries of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008; 57: 429-433 Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophage: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev*. 2005 206: 149–59.

Couri CE, Foss MC, et al. Secondary prevention of type 1 diabetes mellitus: stopping immune destruction and promoting beta-cell regeneration. *Braz J Med Biol Res*. 2006 39(10): 1271-80.

Cua DJ, Sherlock J, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 421(6924): 744-8.

Cui L, Yin S, Liu W, et al. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*. 2007 13:1185–1195.

Curotto L, Lafaille MA. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2002 14(6): 771-8.

Davies, J. et al. CD4+CD45RBlow-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection. *J. Immunol*. 1999 163, 5353–5357.

Di Ianni M, Del Papa B, Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp. Hematol*. 2008 36: 309–318.

Di Nicola M., Carlo-Stella C, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 99(10): 3838-43.

Dieckmann D, Plottner H, et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001 193(11): 1303-10.

Djouad, F., V. Fritz, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005 52(5): 1595-603.

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

Ehrenstein MR, Evans JG, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*. 2004 200(3): 277-85.

El-Badri NS, Maheshwari A, et al. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev*. 2004 13(5): 463-72.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I and II mismatched recipient mice. *Blood*. 2005 106:4057- 4065.

Elson CO, Cong YWCT, Schoeb TR, Mcclanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reserves active colitis in T cell-mediated model in mice, *Gastroenterology*. 2007 132 2359-2370.

Engen, J. & Allison, J. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. 2002 16, 23-35.

Fallon PG, Ballantyne SJ, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*. 2006 203(4): 1105-16.

Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, et al. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NK-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest*. 2005;115:3057Y3071.

Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C et al.: Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* 2009, 183:993-1004.

Fontenot JD e Rudensky AY, Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin Immunol*. 2004 16(2): 73-80.

Fort MM, Cheung J, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. 2001 15(6): 985-95.

Fricke H, Birkhofer A, et al. Characterization of antigens from the human exocrine pancreatic tissue (Pag) relevant as target antigens for autoantibodies in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest* 1999 29(1): 41-5.

Fujino S, Andoh A, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003 52(1): 65-70.

Fuss I J, Heller F, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004 113(10): 1490-7.

Geboes K. From inflammation to lesion. *Acta Gastroenterol Belg*. 1994 57(5-6): 273-84.

Geboes K. IBD Disease and Ulcerative Colitis, *Histopathology of Crohn's Inflammatory bowel disease*. 2003 4E-18 255-276

Gershon RK e Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 18(5): 723-37.

Glennie S, Soeiro I, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 105(7): 2821-7.

Godoi DF, Cardoso CR, Ferraz DB, Provinciatto PR, Cunha FQ, Silva JS, Voltarelli JC. Hematopoietic SCT modulates gut inflammation in experimental inflammatory bowel disease. *Bone Marrow Transplantation*. 2010 45: 1562-1571

Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. *Gastroenterology*. 2009 136:978–989

Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M: Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2009, 60:1006-1019.

Gonzalez-Rey E, Per A, González MA, Rico L, Búscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009.

Gu Z, Akiyama K, Ma X, Zhang H, Feng X, Yao G, Hou Y, Lu L, Gilkeson GS, Silver RM et al.: Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus* 2010, 19:1502-1514.

Haack-Sorensen M, Friis T, Bindselev L, Mortensen S, Johnsen HE, Kastrup J. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008 68(3):192-203.

Hara, M. et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol*. 2001166, 3789–3796.

Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005 129: 50–65.

Hayashi Y, Tsuji S, et al. Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 326(2): 523-31.

Hess D, Li L, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*. 2003 21(7): 763-70.

Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, et al. Inhibition of RICK/nuclear factor-kB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *J Biol Chem*. 2005 280:14981Y14988.

- Hori S, Nomura T, et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 299(5609): 1057-61.
- Hugot JP, Chamaillard M, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 411(6837): 599-603.
- Hurst SD, Muchamuel T, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol*. 2002 169(1): 443-53.
- Ikeda K, Nakajima H, et al. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood*. 2003 101(9): 3594-6.
- Ishida T, Inaba M, et al. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-lpr/lpr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. *J Immunol*. 1994 152(6): 3119-27.
- Ishimaru N, Yamada A, et al. Development of inflammatory bowel disease in Long-Evans Cinnamon rats based on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell dysfunction. *J Immunol*. 2008 180(10): 6997-7008.
- Ivanov II, McKenzie BS, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006 126(6): 1121-33.
- Iwakura Y, and Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation." *J Clin Invest* 2006 116(5): 1218-22.
- Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*. 2008 28:559–70
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 105:4120–4126.
- Jonuleit H, e Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003 171(12): 6323-7.
- Jonuleit H, Schmitt E, et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001 193(11): 1285-94.

Jorgensen C, Ghannam HYS, Pène J, Torcy-Moquet G. Regulatory Cell Phenotype Cell Differentiation and Function and Induce a T cells. *J Immunol.* 2010 185;302-312;

Kang CM, Jang AS, et al. Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 33(3): 290-6.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol.* 2002 168: 1080–1086.

Kleinschek MA, Owyang AM, et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2007 204(1): 161-70.

Kobayashi KS, Chamaillard M, Oguray, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell R.A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005 307 (5710):731-4

Koenders MI, Lubberts E, et al. Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 2005 52(3): 975-83.

Kolls JK e Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004 21(4): 467-76.

Korsmeyer S, Strickland RG, et al. Serum lymphocytotoxic and lymphocytophilic antibody activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1974 67(4): 578-83.

Kozuch PL e Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol.* 2008 14(3): 354-77.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003 101:3722–3729.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984 87:1344-1350.

Kriegelstein CF, Cerwinka WH, et al. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med.* 2001 194(9): 1207-18.

Langrish CL, Chen Y, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 201(2): 233-40.

Le Blanc K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol*. 2003 57, 11–20

Le Blanc K e Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*. 2005 7(1): 36-45.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 103(46): 17438-43.

Lee WT, Yin XM e Vitetta ES. Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. *J. Immunol*. 1990 144, 3288–3295.

Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, et al. ROR γ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology*. 2009 136:257–67

Liang L, Chunlan D, Xiaojun C, Zhihong F, Jie X, Meng L, Xiaoguang Z, Dong Sheng G, Ding W, Weiting D, Delin Z, Zhongchao H. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Mice TNBS-Induced Colitis. 2010.

Lim WC, Hanauer SB. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*. 2004 4(2): 66-85.

Linsley P S et al. CTLA-4 is a second receptor for the B-cell activation antigen B7. *J. Exp. Med*. 1991 174, 561–569.

Liu Z, Lefrancois L. Intestinal epithelial antigen induces mucosal CD8 T cell tolerance, activation, and inflammatory response. *J Immunol*. 2004 173(7): 4324-30.

Maccario, R., M. Podesta, A. Moretta, A. Cometa, P. Comoli, D. Montagna, L. Daudt, A. Ibatici, G. Piaggio, S. Pozzi, et al. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4₊ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90: 516–525.

Mangan PR, Harrington LE, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006 441(7090): 231-4.

Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4⁺CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 2003 197:111–19

Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T (H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nat. Immunol.* 2008 9: 641–649.

Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of KT cells to lymph nodes provides IFN γ for TH1 priming. *Nat Immunol.* 2004 5 1260-1265

Mayet WJ, Press AG, et al. Antibodies to cytoskeletal proteins in patients with Crohn's disease. *Eur J Clin Invest.* 1990 20(5): 516-24.

McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 2002 23(9): 450-5.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002 16 (2) 311-23.

Meirelles LS e Nardi N. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Haematology.* 2003 123, 702–711

Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004 103: 4619–4621.

Middendorp S, Nieuwenhuis EE. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2009 Sep; 2(5): 393-402.

Mittrucker HW, e Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol.* 2004 34(2): 306-12.

Moadsiri A, et al. Mesenchymal stem cells enhance xenochimerism in NK-depleted hosts. *Surgery.* 2006 140, 315–321

Moretta A, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996 14, 619–648

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989 96:795-803.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003 3(4): 331-41.

Murphy CA, Langrish CL, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003 198(12): 1951-7.

Nakae S, Komiyama Y, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*. 2002 17(3): 375-87.

Nakae S, Nambu A, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003 171(11): 6173-7.

Neilly PJD, Gardiner KR, Kirk SJ, Jennings G, Anderson NH, Elisa M, Rowlands BJ. Endotoxaemia and cytokine production in Experimental Colitis. *British Journal of Surgery*. 1995 82, 1479-1482.

Ng WF, Duggan PJ, et al. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. 2001 98(9): 2736-44.

Nocentini, G. et al. A new member of the tumour-necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T-cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 94, 6216–6221 (1997).

Norman K, Kirchner H, et al. Malnutrition affects quality of life in gastroenterology patients. *World J Gastroenterol*. 2006 12(21): 3380-5.

Nurieva R, Yang XO, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007 448(7152): 480-3.

Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Immunol*. 2004 110:55–62

Ogura Y, Bonen DK, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 411(6837): 603-6.

Oshitani N, Hato F, et al. Expression of 4C8 antigen, a novel transendothelial migration-associated molecule on activated T lymphocytes, in inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2002 197(5): 589-94.

Owaki T, Asakawa M, et al. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol.* 2005;175(4): 2191-200.

Papadakis KA e Targan SR. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999 28(2): 283-96.

Parekkadan B, Tilles AW, Yarmush ML: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independent of regulatory T cells. *Stem Cells* 2008, 26:1913-1919.

Pende D. et al. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood.* 2006 107, 2030–2036

Pflanz S, Timans JC, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity.* 2002 16(6): 779-90.

Pirhonen JJ, Siren, et al. IFN-alpha regulates Toll-like receptor-mediated IL-27 gene expression in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007 82(5): 1185-92.

Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B. & Coffman, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in CB-17 scid mice. *Int. Immunol.* 1993 5, 1461–1471.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Hematol.* 2005 129:118–129.

Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2006 312(12): 2169-79.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *JExp Med.* 2000 192 2 295-302.

Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008 2:141–150.

Rescigno M, Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest.* 2009 119: 2441–50.

Rijnierse A, Koster AS, et al. Critical role for mast cells in the pathogenesis of 2,4-dinitrobenzene-induced murine colonic hypersensitivity reaction. *J Immunol* 2006 176(7): 4375-84.

Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, Fausa O, Scott H. Increased macrophage subsets in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut*. 1994 35: 669–74.

Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1997; 112: 1493–505.

Russel MG, e Stockbrugger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol*. 1996 31(5): 417-27.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004 22: 531-62.

Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 109: 228–234.

Schirbel A.e Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy *Journal of Digestive Diseases*. 2010 11; 266–276

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y e Sakaguchi S. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol*. 2002 3, 135–142

Schreiber S. Inflammatory bowel disease: immunologic concepts. *Hepatogastroenterology*. 2000 47(31): 15-28.

Selby WS, Poulter LW, Hobbs S, Jewell DP, Janossy G. Heterogeneity of HLA-DR positive histiocytes of human intestinal lamina propria: a combined histochemical and immunological analysis. *J Clin Pathol*. 1983 36: 379–84.

Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 26: 212–222.

Selve N, Wohrmann T. Intestinal inflammation in TNBS sensitized rats as a model of chronic inflammatory bowel disease. *Mediators of inflammation*. 1992 1, 121-126.

Sepulveda SE, Beltran CJ, et al. Inflammatory bowel diseases: an immunological approach. *Rev Med Chil.* 2008 136(3): 367-75.

Sharma MD, Badan B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 2007 (9) 2570-82

Shen W, Scott K, Durum, Synergy of IL-23 and Th17 Cytokines: New Light on Inflammatory Bowel Disease. *Neurochem Res.* 2010 35: 940-946

Singh B, Read S, et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2001 182: 190-200.

Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophage: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev.* 2005 206: 149–59.

Strath M, Warren D J e Sanderson C J. Detection of eosinophis using na eosinophil peroxidase assay. *J Immunol Methods.* 1985 83: 209-215.

Strober W, Fuss I, et al. The fundamental basis of inflammatory bowel disease." *J Clin Invest.* 2007 117(3): 514-21.

Suri-Payer E, Amar AZ, et al. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998 160(3): 1212-8.

Takahashi T, Kuniyasu Y, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 199810(12): 1969-80.

Takahashi T. et al. Immunologic self-tolerance is maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 2000192, 303–310.

Te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:995-9.

Touil T, Fitzgerald D, et al. Pathophysiology of interleukin-23 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Drug News Perspect.* 2006 19(2): 77-83.

Tse WT, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003 75, 389–397

Uccelli A, Moretta L, et al. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006 36(10): 2566-73.

Vieth M e Tannapfel A. New pieces of the pathogenetic mosaic in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 18(2): 123-4.

Voltarelli JC, Couri CE, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Jama*. 2007 297(14): 1568-76.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol*. 2007 25:821–52

Whiting CV, Tarlton JF, et al. Abnormal mucosal extracellular matrix deposition is associated with increased TGF-beta receptor-expressing mesenchymal cells in a mouse model of colitis. *J Histochem Cytochem*. 2003 51(9): 1177-89.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, B. Basham, Smith K, Chen T, Morel F, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol*. 2007 8: 950–957.

Wurster AL, Rodgers VL, et al. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med*. 2002196(7): 969-77.

Xu L, Kitani A, et al. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007 178(11): 6725-9.

Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24:2582–2591.

Yang SK, Choi MS, et al. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids. *Am J Gastroenterol*. 2002 97(1): 126-32.

Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 2008 205:1063–75

Yu QT, Saruta M, et al. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 13(2): 191-9.

Zappia E, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005 106(5): 1755-61.

Zelenika D. et al. Regulatory T cells overexpress a subset of TH2 gene transcripts. *J. Immunol*. 2002 168, 1069–1079.

Zhang J, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol*. 2005 195(1): 16-26.

Zhang Z, Zheng M, Bindas J, Schwarzenberger P, Kolls JK. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 12:382–88

Zhou L, Ivanov II, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007 8(9): 967-74.

Zhu J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2010 88: 244-249.

ANEXOS

ANEXO – 1



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

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

5

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG

Termo de Consentimento

TÍTULO DO PROJETO: Potencial terapêutico de células mesenquimais estromais na doença inflamatória intestinal

Você está sendo convidado a participar do estudo “**Potencial terapêutico de células mesenquimais estromais na doença inflamatória intestinal**”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este e, por isso, sua participação é importante. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial terapêutico das células mesenquimais estromais humanas na doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente. Ele ajudará no tratamento para os pacientes que possuem esta doença. Você pode participar desse estudo como paciente saudável que apenas doou gordura de sua cirurgia. Caso você participe, será coletada a gordura que seria descartada após sua lipoaspiração. Você não terá nenhum desconforto adicional, como os já previstos para a sua cirurgia.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba,//.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato do pesquisador orientador: (34) 3318 5203

ANEXO – 3



7/7

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

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 CEP/UFTM: 05-08-2009	
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1447	
Reagentes para PCR: kits de extração de RNA e confecção de cDNA, reagentes para extração de RNA, enzimas, cubetas, SYBR green, dNTPs, placas de PCR, plásticos selantes para placas de PCR, materiais e reagentes utilizados no PCR, etc.	12.000,00
Reagentes para citometria de fluxo: enzimas para digestão de tecidos, liberases, colagenases, anticorpos, BSA, soro bovino fetal, meio de cultura RPMI, software para análise das aquisições no citômetro, isogen, DNase, etc.	28.000,00
Reagentes para cultura de células e ensaios <i>in vitro</i>: <i>beads</i> magnéticas, concanavalina A, anticorpos anti-CD3, CFSE, meio de cultura α -MEM, Ficoll Hypaque, DMSO, placas de cultura, soro especial para cultivo de MSCs, tripsina, anticorpos e meios para diferenciação e caracterização das MSCs, etc.	25.000,00
Material de escritório/outros: Papel branco (tamanhos carta e A4), papel de fax, toners, fitas/cartuchos de impressora, CDs para gravação de dados, grampeadores, cola, envelopes, participação em congressos nacionais e internacionais, etc.	3.000,00
Total parcial	100.000,00

Fonte: Processo CNPq nº 573841/2008-0 - Edital 17/2008 – Terapia Celular

12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

Salário de professora adjunta da UFTM.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO

O Termo será obtido de indivíduos saudáveis e voluntários que irão realizar procedimento normal de cirurgia plástica/lipoaspiração na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelos pesquisadores, através de esclarecimentos individuais e coleta das assinaturas.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.**15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES**

PARECER DO CEP: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 13-11-2009

Prof.^a Ana Palmira Soares dos Santos
 Coordenadora