CAROLINA MANGANELI POLONIO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REGULADORA DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS ENDOMETRIAIS NO MODELO DE
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

CAROLINA MANGANELI POLONIO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REGULADORA DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS ENDOMETRIAIS NO MODELO DE
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre
Schatzmann Peron

Versão Original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Manganeli Polonio, Carolina
Avaliação da Capacidade Reguladoras de Células
Tronco Mesenquimais Endometriais no Modelo de
Encefalomielite Experimental Autoimune / Carolina
Manganeli Polonio; orientador Jean Pierre
Schatzmann Peron. -- São Paulo, 2017.
90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Encefalomielite Experimental Autoimune.. 2.
Células Tronco Mesenquimais Endometriais.. 3.
Imunomodulação.. I. Schatzmann Peron, Jean Pierre,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Manganeli Polonio

Titulo da Dissertação/Tese: Avaliação da Capacidade Reguladoras de Células Tronco Mesenquimais Endometriais no Modelo de Encefalomielite Experimental Autoimune.

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

☐ **Aprovado(a)** ☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Avaliação do Perfil de Citocinas e miRNAs de Células Tronco Mesenquimais Endometriais e de Sua Capacidade Reguladora no Modelo de Encefalomielite Experimental Auto-Imune*", registrada sob nº 78, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 11/9/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) **Jean Pierre Schatzmann Peron** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Carolina Manganeli Polonio, Carla Longo de Freitas, Cristiano Rossato, Wesley Nogueira Brandão*. Esta licença de uso de animais expira em 11/09/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Cytokine Assessment and miRNAs Profile of Endometrial Mesenchymal Stem Cells and Their Regulatory Capacity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model*", registered as **Number 78**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 9/11/2015.

Under this license, **Jean Pierre Schatzmann Peron** (Principal Investigator) and team members *Carolina Manganeli Polonio, Carla Longo de Freitas, Cristiano Rossato, Wesley Nogueira Brandão* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 9/11/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 15 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.095.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **078/2015/CEUA**, aprovado em 11/09/2015, e por solicitação do Prof. Dr. **Jean Pierre Schatzmann Peron**, do departamento de Imunologia, informo que o título do projeto da aluna de mestrado **Carolina Manganelli Polonio** foi alterado para "**Avaliação da capacidade reguladora de células tronco mesenquimais endometriais no modelo de encefalomielite experimental auto-imune**" por dificuldades na compra de reagentes, que impossibilitaram a realização de alguns experimentos.

São Paulo, 29 de maio de 2017.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP

**Aos meus pais Pedro e Marisa, e minha
irmã Tamires, com todo amor e gratidão.**

**Por proporcionarem a realização de
sonhos e sempre acreditarem em mim.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Pedro e Marisa, e minha irmã Tamires, que são meus maiores exemplos de conduta, que me moldaram para ser alguém que me orgulho. Por me alicerçarem todos os dias e me proporcionarem a oportunidade de seguir meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, meu orientador, companheiro e amigo, por todo apoio científico e psicológico, pela confiança, pela liberdade e principalmente pela parceria. Meu sincero agradecimento por tornar todos os dias difíceis mais leves e pela dedicação diária em tentar nos tornar cada vez mais sábios;

À tia Marta, por dar todo seu amor e afeto e por me passar todos os seus princípios, auxiliando na formação do meu caráter;

À avó Ida, pelo simples fato de não existir colo mais aconchegante que o seu. Eternas saudades;

Ao avô Manuel, por dedicação total e imenso carinho à família;

Aos meus primos Amanda, Joice, Clayton, Guilherme e Talita agradeço por todos os anos juntos e todo amor e gratidão que sentimos;

À Larissa e Laura que são as pessoas mais importantes em nossas vidas, um amor imensurável por essas duas riquezas;

Ao meu cunhado Rafael, por fazer minha irmã e toda família muito feliz;

Aos tios Adail e Eliana, que apesar de não sermos “de sangue”, me acolheram com tanto afeto e auxiliaram meus pais em minha formação e caráter;

À minha amiga Tuany, por sermos tão diferentes, por sempre caminharmos juntas e nunca desistirmos uma da outra;

À Andrea e Drielly, por caminharem junto a mim em todos os momentos. Somos o maior exemplo que amizade verdadeira não esmorece com o tempo;

À Nayane e Tais, por termos alicerçado uma a outra em um dos momentos mais difíceis de nossas vidas. Obrigada pelo respeito, pelas alegrias e pela força, que venham muitos anos de parceria pela frente;

À Evilin e Liliane, por terem me ajudado a dar os primeiros passos na ciência, por toda paciência, e principalmente por acreditarem em mim, quando nem eu mesma acreditava.

Aos colegas de laboratório, Carla, Nagela, Lilian, Cristiano e Wesley, por todo auxílio científico, convívio excepcionalmente agradável, uma vez que nos tornamos amigos. Esse trabalho também é fruto do nosso trabalho em equipe;

À Apurwa, nossa indiana, por ter paciência e nos auxiliar muito no aprendizado do inglês. Por nos trazer uma cultura diferente.

Aos colegas pós-graduandos do ICB, por nos ajudarmos todos os dias, seja na discussão de experimentos, ou no auxílio com reagentes. Estamos cada vez mais unidos.

À minha banca de qualificação: Prof. Dr. Alexandre Basso, Prof. Dr. Gustavo Mendes-Amarantes e Dr. Danilo Candido, por todas as sugestões;

Aos funcionários Maria Eni, Claudia, Aurea e Sandra, obrigada por nos aturarem diariamente e nos proporcionarem condições melhores de trabalho;

Ao Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo e todos os funcionários, por me proporcionarem uma experiência única durante o mestrado;

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento durante o mestrado de Carolina Manganeli Polonio, nº USP 9565150.

“Para ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas”.

(Steve Jobs)

“Um bicho conhece sua floresta; e mesmo que se perca – perder-se também é caminho”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

POLONIO, C. M. **Avaliação da Capacidade Reguladora de Células Tronco Mesenquimais Endometriais no Modelo de Encefalomielite Experimental Autoimune.** 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica desencadeada por células T autorreativas contra antígenos proteicos da mielina produzida por oligodendrócitos no sistema nervoso central (SNC). Após ativação na periferia, estas migram ao SNC promovendo o rompimento da barreira hematoencefálica, o infiltrado inflamatório e a destruição da bainha de mielina que envolve os axônios neuronais. A encefalomielite experimental autoimune (EAE) é o modelo murino mais utilizado para o estudo da EM. As células-tronco estromais (MSC) são células multipotentes, não diferenciadas e imunomoduladoras, que vêm sendo estudadas nos últimos anos como medida terapêutica em diversos modelos inflamatórios, incluindo a EM. As tubas uterinas e o útero de camundongos fêmeas são órgãos ricos em células mesenquimais (meMSC) que são pouco utilizadas em estudos, e cuja capacidade imunomoduladora é pouco conhecida. Dessa forma, no presente projeto, caracterizamos a obtenção dessa população e avaliamos sua capacidade imunossupressora utilizando o modelo de EAE. Observamos que o tratamento é capaz de modular o perfil de linfócitos T CD4⁺ durante sua ativação nos linfonodos, induzindo o direcionamento para a subpopulação Tr1 e atenuando as Th1 e Th17. Consequentemente, houve uma diminuição do número de células infiltrantes no SNC associado a uma menor ativação de células da microglia. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que as meMSC utilizadas como tratamento são capazes de atrasar o desenvolvimento da EAE e, portanto, evidenciando o caráter imunomodulador das MSCs derivadas do endométrio, chamando a atenção para seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: Encefalomielite Experimental Autoimune. Células Tronco Mesenquimais Endometriais. Imunomodulação.

ABSTRACT

POLONIO, C. M. Evaluation of the Regulatory Capacity of Endometrial Mesenchymal Stem Cells in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model. 2017. 90 f. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease triggered by autoreactive T cells against myelin protein antigens produced by oligodendrocytes in the central nervous system (CNS). After activation in the periphery, these cells migrate to the CNS promoting the rupture of the blood-brain barrier (BBB), the inflammatory infiltrate and the destruction of the myelin sheath that surrounds the neuronal axons. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is the most commonly used murine model for the study of MS. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multipotent, undifferentiated and immunomodulatory cells that have been studied in recent years as a therapeutic measure in several inflammatory models, including MS. The uterine tubes and uterus of female mice are organs rich in mesenchymal cells (meMSC) which are rarely used and whose immunomodulatory capacity is unknown. Thus, in the present work, we characterized the extraction of this population and evaluated its immunosuppressive capacity using the EAE model. We observed that the meMSC treatment is capable of modulating the CD4 T lymphocyte profile during its activation in the lymph nodes, inducing the expansion of the Tr1 subpopulation and attenuating Th1 and Th17. Consequently, there was a decrease in the number of infiltrating cells in the CNS associated with a reduction of microglial activation. Taken together, our results demonstrated that the meMSCs used as treatment are capable of delaying the development of EAE, therefore, evidencing its immunomodulatory features drawing attention to its therapeutic potential.

Keywords: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Endometrium Mesenchymal Stem Cells. Immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica da endemicidade da EM no mundo.

Figura 2 – Antígenos alvo durante o desenvolvimento da EAE.

Figura 3 – Esquema representativo da fisiopatologia da EM e EAE.

Figura 4 - Efeitos imunomodulatórios das MSCs conhecidos.

Figura 5 – Estratégia de gate para análise de diferentes populações de linfócitos.

Figura 6 – Estratégia de gate para análise de moléculas de ativação de células dendríticas, macrófagos e microglia.

Figura 7 - Histologia da Tuba Uterina e Útero.

Figura 8 - Ensaios Imunohistoquímicos da Tuba Uterina e Útero.

Figura 9 - Caracterização das Fases Estrais.

Figura 10 - Rendimento de meMSC nas Fases Estrais.

Figura 11 - Diferenciação de multilinhagens *in vitro*.

Figura 12 - Caracterização fenotípica das meMSC.

Figura 13 - Escore clínico de animais com EAE tratados ou não com meMSC.

Figura 14 - As meMSC não são capazes de modular a expressão de moléculas de ativação em células dendríticas dos linfonodos no modelo de EAE na monta da resposta imune.

Figura 15 - As meMSC não são capazes de modular a expressão de moléculas de ativação em macrófagos dos linfonodos no modelo de EAE na monta da resposta imune.

Figura 16 - As meMSC são capazes de modular o perfil de linfócitos T CD4⁺ dos linfonodos durante o início da resposta imune no modelo de EAE.

Figura 17 - Análise do perfil de citocinas dos linfonodos de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a monta da resposta imune.

Figura 18 - Expressão gênica dos linfonodos de animais com EAE tratados ou não com meMSC na monta da resposta imune.

Figura 19 - Proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos linfonodos de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante monta da resposta imune.

Figura 20 - As meMSC são capazes de reduzir a neuroinflamação e dano histopatológico.

Figura 21 - As meMSC são capazes diminuir a infiltração de macrófagos e ativação da microglia no SNC no modelo de EAE.

Figura 22 - As meMSC são capazes de modular o perfil de linfócitos T CD4⁺ infiltrantes do SNC no modelo de EAE.

Figura 23 - As meMSC são capazes de modular o perfil de linfócitos T CD8⁺ infiltrantes do SNC no modelo de EAE.

Figura 24 - Análise do perfil de citocinas de células mononucleares do SNC de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a resposta efetora da doença.

Figura 25 - Expressão gênica da medula espinhal de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a fase efetora da doença.

Figura 26 - Análise do perfil de citocinas do baço de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a fase efetora da doença.

Figura 27 - Expressão gênica do baço de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a fase efetora da doença.

Figura 28 - Análise da produção de citocinas dos linfócitos T CD4⁺ em co-cultura com as meMSC.

LISTA DE ABRAVIATURAS

ABEM – Associação Brasileira de Esclerose Múltipla

Ac – anticorpo

Actb – Beta actina

AD-MSC – do inglês, *Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell*

APCs – Células apresentadoras de antígeno

BBB – do inglês, *blood-brain barrier*

BCR – do inglês, *B Cells Receptor*

BDNF – do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*

BHE – Barreira Hemato Encefálica

BM-MSC – do inglês, *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*

BSLCR – Barreira Sangue Líquido Cefalorraquidiano

CBA – do inglês, *Cytometric bead array*

cDNA – DNA complementar

CFA – do inglês, *Compleat Freund's Adjuvant*

CNS – do inglês, *Central Nervous System*

CTLs – do inglês, *Cytotoxic T Lymphocytes*

DC – do inglês, *Dendritic Cells*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAE – Encefalomielite Experimental Autoimune

EAU - do inglês, *Experimental Autoimmune Uveitis*

EM – Esclerose Múltipla

Fig. – Figura

Foxp3 – do inglês, *Forkhead box P3*

GDNF – do inglês, *Glial cell-derived neurotrophic factor*

GMSC – do inglês, *Gingiva Mesenchymal Stem Cell*

HE – Hematoxilina e eosina

hedMSC – do inglês, *Human Endometrial Mesenchymal Stem Cell*

HLA – do inglês, *Human Leukocyte Antigen*

i.p. – intraperitoneal

ICAM-1 – do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule 1*

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IDO – Indoleamina-2,3- dioxigenase

IFN – interferon

IL – interleucina

kg – Quilogramas

KO – do inglês, *knockout*

MAG - do inglês, *Myelin-associated Glycoprotein*

MBP - do inglês, *Myelin Basic Protein*

MCSF – do inglês, *Macrophage Colony-stimulating Factor*

meMSC - do inglês, *Murine Endometrial Mesenchymal Stem Cell*

mg – Miligramas

MHC I – do inglês, *Major Histocompatibility Complex I*

MHC II – do inglês, *Major Histocompatibility Complex II*

mL – Mililitros

MMP-9 – metaloproteinase 9

MOG₃₅₋₅₅ – do inglês, *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*

MS – do inglês, *Multiple Sclerosis*

MSC – do inglês, *Mesenchymal Stem Cell*

MSIF - do inglês, *Multiple Sclerosis International Federation*

NGF – do inglês, *Nerve growth factor*

NK – do inglês, *Natural Killer*

PBMC – do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PFA – Paraformaldeído

PGE2 – Prostaglandina E2

pH – Concentração hidrogeniônica

PLP – do inglês, *Proteolipid Protein*

RNA – Ácido ribonucleico

Rorc – do inglês, *RAR-related orphan receptor C*

ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*

RPMI – meio *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR – Reação da polimerase em cadeia em tempo real

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SP1R1 – do inglês, *sphingosine-1-phosphate receptor 1*

STAT – do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*

STAT – sinal ativador e transdutor de transcrição

Tbx21 – do inglês, *T-box transcription factor*

TCR – do inglês, *T Cells Receptor*

TGF- β – Fator de transformação do crescimento β

Th – Linfócitos T auxiliares, ou do inglês, *T helper*

TNF- α – do inglês, *Tumor necrosis fator- α*

Tr1 – T reguladora do tipo 1

Treg – Célula T reguladora

USP – Universidade de São Paulo

VCAM – do inglês, *Vascular cell adhesion protein 1*

WHO - do inglês, *World Health Organization*

WT – do inglês, *Wild tipe*

μg – Microgramas

μL – Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Esclerose Múltipla (EM).....	20
1.2 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	22
1.3 Células-Tronco Mesenquimais (MSC).....	26
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivos Gerais.....	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Histologia	31
3.2.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina	31
3.2.2 Imunohistoquímica	32
3.2.3 Coloração por Luxol Fast	33
3.3 Identificação das fases do ciclo estral	33
3.4 Obtenção e cultura de meMSC.....	33
3.5 Diferenciação das meMSC.....	34
3.5.1 Diferenciação adipogênica	34
3.5.2 Diferenciação condrogênica	34
3.5.3 Diferenciação osteogênica	35
3.6 Extrações de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	35
3.7 Quantificação por PCR em Tempo Real.....	36
3.8 Indução de EAE e tratamento com as meMSC.....	37
3.9 Obtenção de células do Sistema Nervoso Central	37
3.10 Obtenção de células do baço e dos linfonodos.....	38
3.11 Co-cultura de meMSC e linfócitos TCD4 ⁺	38

3.12 Análises por citometria de fluxo.....	38
3.12.1 Dosagem de citocinas	38
3.12.2 Avaliação de células <i>Th1</i> , <i>Th17</i> e <i>Tr1</i>	39
3.12.3 Análise fenotípica das meMSC	39
3.12.4 Resposta proliferativa <i>in vitro</i>	40
3.12.5 Análise de moléculas de ativação em células dendríticas, macrófagos e microglia.....	41
3.13 Análises estatísticas	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Obtenção e caracterização das meMSC	44
4.2 O tratamento com as meMSC é capaz de atrasar o aparecimento dos sinais clínicos da EAE	52
4.3 Modulação desencadeada por meMSC na ativação da resposta imune adaptativa nos linfonodos	53
4.3.1 Efeitos das meMSC sobre apresentação de antígenos	53
4.3.2 Papel das meMSC nas subpopulações de linfócitos <i>T</i>	56
4.4 Avaliação dos efeitos do tratamento com as meMSC em células residentes e infiltrantes do SNC	61
4.4.1 Papel das meMSC na infiltração de macrófagos e ativação da microglia	62
4.4.2 Papel das meMSC na infiltração das subpopulações de linfócitos <i>T</i>	64
4.5 Avaliação das células recirculantes no baço perante o tratamento com as meMSC	69
4.6 Análise da capacidade das meMSC modularem a produção de citocinas <i>in vitro</i>	71
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS	88
A - The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models	89
B - Zika Virus Congenital Syndrome: Experimental Models and Clinical Aspects	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose Múltipla (EM)

As doenças auto-imunes do sistema nervoso central são descritas por ocasionar a perda progressiva das funções deste, provocada pela inflamação local e subsequente morte neuronal. A Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*) (WHO, 2016) relatou que as doenças neurológicas em geral afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo e estima-se que 6,8 milhões morrem por ano por conta de doenças relacionadas ao cérebro. O tratamento dessas doenças é complexo, uma vez que as causas e biomarcadores são pouco conhecidos. Hoje em dia, muitos grupos têm se dedicado aos estudos envolvidos com medidas terapêuticas para essas desordens do SNC, principalmente com o objetivo de diminuir sua progressão clínica (FERRARA, 2016; HANAMSAGAR; BILBO, 2016).

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória crônica mais comum do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por constantes episódios de desmielinização provocada por respostas das células T e B autorreativas contra antígenos proteicos derivados de mielina. É uma enfermidade que acomete principalmente jovens adultos, em média de 20-40 anos de idade, com maior incidência em mulheres do que em homens (3:1); de etnia branca, afetando 0,05-0,15% dos caucasianos e predominante na América do Norte e na Europa (1 a 3/500 habitantes). O Brasil é considerado um país de baixa incidência (5/100.000 habitantes), com exceção de São Paulo, Belo Horizonte e Botucatu, que são cidades com maior incidência média (5 a 30/100.000 habitantes), devido provavelmente à diversidade genética e miscigenação dessas cidades brasileiras (Fig. 1) (GRZESIUK, 2006; MOREIRA et al., 2000; NOSEWORTHY et al., 2000).

Figura 5 - Distribuição geográfica da endemicidade da EM no mundo.

Fonte: Atlas da EM 2013. Multiple Sclerosis International Federation (MSIF). Disponível em: <http://www.atlasofms.org/>. Tradução: Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (Abem).

Na patogenia da EM existe uma pré-disposição genética associada a fatores ambientais que provocam uma disfunção do sistema imune, promovendo a apresentação de proteínas da bainha de mielina pelas células apresentadoras de antígenos (APC - *antigen-presenting cells*) às células T autorreativas. Tal fato leva à quebra da tolerância e subsequente infiltração de células do sistema imune, culminando na desmielinização, dano axonal e o desenvolvimento de lesões no cérebro e na medula espinal, conhecidas como *scleras* ou cicatrizes. Consequentemente, os pacientes que desenvolvem EM apresentam sinais como ataxia, fadiga, perda da coordenação motora, dificuldades cognitivas, danos visuais e sensoriais com diferentes graus de frequência e severidade entre os doentes (GOVERMAN, 2009). Dentre os genes envolvidos, os do HLA (*Human Leukocyte Antigen*) são conhecidos por influenciar a atividade dos linfócitos T, sendo que alguns haplótipos se relacionam claramente com uma maior susceptibilidade à doença, como: HLA-DRB5*0101, HLADRB1*1501, HLA-DQB1*0602, HLA-DQA1*0102. Além destes, genes de citocinas, moléculas coestimuladoras e de vias de transdução de sinais também podem estar envolvidos (OKSERNBERG; HAUSER, 2005).

Os três padrões mais comuns de evolução clínica observados são o recorrente-remittente, primariamente progressiva e secundariamente progressiva. A recorrente-remittente é o padrão mais comum, acometendo 85% dos pacientes com EM, sendo caracterizada por ataques agudos, ou seja, episódios em que os sintomas se agravam abruptamente, seguidos de uma remissão total ou parcial. Durante a remissão, os pacientes ficam estáveis, sem deterioração (VARATHARAY; GALEA, 2016). Infelizmente, cerca de 90% dos pacientes com esse padrão se agravam para secundariamente progressiva, onde apresentam uma deterioração gradual e essa evolução clínica tem relação com sexo e com a idade do aparecimento dos sintomas motores (YOUNG et al., 2012). A primariamente progressiva afeta de 10-15% dos pacientes e é definida por provocar danos funcionais irreversíveis de maneira estável, lenta e progressiva (KREMENCHUTZKY et al., 1999).

Como não se sabe ao certo qual o ponto chave na etiologia e na patogênese da doença e pelo sistema imune ser muito dinâmico, seu tratamento se torna complicado. Essas são algumas das abordagens terapêuticas utilizadas na EM: i) o IFN- β a e o IFN- β b que suprimem as respostas Th1 e intensificam as respostas Th2; ii) o acetato glatiramer (CopaxoneTM) que modula linfócitos T autorreativos e levam à tolerância utilizando antígenos semelhantes à mielina; iii) a mitoxantrona que inibe a proliferação de linfócitos T, B e macrófagos (PALMER, 2013; PALMERAND; ALAVIJEH, 2012); iv) o Natalizumab, um anticorpo monoclonal integrina anti- α 4- β 1, que previne a migração de leucócitos para o SNC (TUBRIDY et al., 1999; YEDNOCK et al., 1992), o v) rituximab e o oclizumab, anticorpos monoclonais anti-CD20 utilizados para a depleção de linfócitos B, o vi) Fingolimode, capaz de reduzir o número de linfócitos circulantes prevenindo a saída dos mesmos do linfonodo através da modulação de SP1R1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*) (PELLETIERAND; HAFLER, 2012), e a vii) teriflunomida um imunomodulador que possui propriedades anti-inflamatórias (PALMER, 2010). Todas essas abordagens visam ao impedimento da ativação dos clones autoreativos, assim como de seu alcance ao SNC.

1.2 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A encefalomielite autoimune experimental (EAE – *experimental autoimmune encephalomyelitis*) é o principal modelo animal para o estudo da EM, estabelecido há mais

de 80 anos, e utilizado até hoje. A indução da EAE (Fig. 2) é feita através da inoculação subcutânea em diversas linhagens de camundongos de antígenos proteicos da bainha de mielina produzida por oligodendrócitos como o MOG₃₅₋₅₅ (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), MBP (*Myelin Basic Protein*), PLP (*Proteolipoprotein*) ou MAG (*Myelin-associated glycoprotein*) emulsificados em CFA (*Complete Freund Adjuvant*) (MILLER; LEARY, 2007; RIVERS; SPRUNT; GERRY, 1933).

Figura 6 – Antígenos alvo durante o desenvolvimento da EAE. Proteínas da bainha de mielina usadas como alvo para o desenvolvimento da resposta autoimune e indução da EAE.

Fonte: (HEMMER; ARCHELOS; HARTUNG, 2002).

Uma vez que as APCs, como as células dendríticas macrófagos ou mesmo linfócitos B, apresentam esses antígenos de mielina para células T autorreativas na periferia, há ativação e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Essas células sofrem expansão clonal, diferenciação em subpopulações como linfócitos Th1 e Th17 que posteriormente migra para o SNC, secretando muitos mediadores que iniciam o processo inflamatório local, principalmente ativando as células da glia e, posteriormente, recrutando mais células infiltrantes da periferia (MILLER; LEARY, 2007; RIVERS; SPRUNT; GERRY, 1933).

A barreira hematoencefálica (BHE) que circunda as vênulas do parênquima cerebral e a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BSLCR) que circunda o plexo coróide e vênulas

das meninges limitam o acesso de células circulantes ao SNC. As junções oclusivas (*Tight junctions*) presentes entre as células endoteliais da BHE e entre as células epiteliais da BSLCR são as responsáveis por essa inacessibilidade de células circulantes (HEMMER; ARCHELOS; HARTUNG, 2002). Porém, o processo inflamatório gerado provoca a ruptura dessas barreiras, que pode acontecer por mudanças nas junções oclusivas, desnudação do glicocálice, aumento de tráfego vesicular e astrocitopatias em combinação com mudanças e danos endoteliais (RANSOHOFF; KIVISAKK; KIDD, 2003; WEKERLE et al., 1994). Assim, os linfócitos T autorreativos, como os Th17 por exemplo, passam a expressar receptores de quimiocinas como CCR6, cuja quimiocinas ligante, o CCL20, é constitutivamente presente em células epiteliais da BSLCR (REBOLDI et al., 2009). Concomitantemente, linfócitos Th1 expressam a integrina alfa4-Beta7, importante no endereçamento destes ao SNC (HOTHHAMMER et al., 2011)

Com a entrada no SNC, as células T específicas para antígenos da mielina são reativadas por células dendríticas (BAILEY; MACMAHON, 2007) ou macrófagos residentes (PONOMAREV et al., 2005). As células Th1 são células induzidas pela citocina IL-12 ativando STAT-4 e o fator de transcrição T-bet culminando a produção da citocina IFN- γ , que é capaz de aumentar a capacidade da micróglia em apresentar antígenos para outras células T, por aumentar a expressão de moléculas de MHC de classe I e II e moléculas coestimuladoras. Embora, IFN- γ tenha um importante papel na patogênese de EAE, células Th17 que secretam IL-17 são descritas por serem mais relevantes do que as células Th1, uma vez que camundongos IL-17 KO (*knockouts*) são altamente resistentes à indução da EAE, enquanto camundongos IFN- γ KO são mais susceptíveis (KOMIYAMA et al., 2006). As células T CD4⁺ que expressam o fator de transcrição ROR γ T (IVANOV et al., 2006) produzem IL-17A, IL-17F e IL-22 (KORN et al., 2009) e dependente da sinalização gerada por TGF- β , IL-6 e IL-1 (CHUNG, 2009). A importância de IL-17 na indução de EAE baseia-se no fato de que células residentes do SNC, como astrócitos e micróglia expressam IL-17R constitutivamente (DAS SARMA et al., 2009), provocando a ativação dessas células, levando à secreção MMP-9, de citocinas como IL-6, quimiocinas como CXCL2 e CXCL9, moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM (KANG et al., 2010). Com isso, há o recrutamento de outras células do sistema imune, como

neutrófilos e macrófagos para o SNC que irão provocar a retroalimentação positiva do processo inflamatório.

Além destes, os linfócitos T CD8⁺ também participam ativamente do processo lesivo, uma vez que estes reconhecem os antígenos via MHC de classe I. Com isso, há a liberação desses grânulos contendo perforinas, que são responsáveis por permeabilizar a membrana dos oligodendrócitos, e as granzimas que irão induzir a morte dos mesmos (GOVERMAN; PERCHELLET; HUSEBY, 2005; PERON et al., 2010). Além disso, os linfócitos B reencontram os antígenos no SNC via BCR (ARCHELOS; STORCH; HARTUNG, 2000), liberam citocinas pró-inflamatórias e se maturam em plasmócitos secretores de auto-anticorpos principalmente do isótipo IgG (IgG1 e IgG3) (GREVE et al., 2001; LOSY; MEHTA; WISNIEWSKI, 1990).

As células residentes do SNC também estão amplamente envolvidas na patogênese da EAE e da EM, como as células da micróglia, que são as menores células da neuroglia e possuem corpos celulares alongados com muitos prolongamentos curtos e extremamente ramificados. Essas células fazem a vigilância ativa do parênquima cerebral e da medula espinal, porém com o processo inflamatório iniciado, as micróglias ativadas se proliferam, sofrem mudanças na expressão de moléculas de ativação (CD80, CD86 e MHC II) e migram para o local de lesão, agindo em conjunto com os macrófagos infiltrantes. Assim, essas células assumem um fenótipo conhecido por M1, caracterizados pela alta produção de ROS e citocinas inflamatórias. Essas células auxiliam no dano oxidativo de células do SNC, na abertura da BHE e extravasamento de leucócitos, bem como na polarização de linfócitos Th1 (STAKOVIC et al., 2016). Com isso, o processo inflamatório é mantido, promovendo a degradação gradativa da bainha de mielina e a degeneração axonal, prejudicando o impulso nervoso, responsável por todos os sinais e sintomas da doença. (Fig. 3)

Figura 7 – Esquema representativo da fisiopatologia da EM e EAE. Os oligodendrócitos são células do SNC produtoras da mielina, que é responsável pelo isolamento elétrico dos axônios. Na EM ou EAE, as células dendríticas apresentam antígenos de mielina para linfócitos T e linfócitos B infiltrantes. Os linfócitos T CD4⁺ reativados por micrógliia produzem citocinas que irão favorecer o processo inflamatório e os T CD8⁺ atuam diretamente nos oligodendrócitos e na bainha de mielina do neurônio.

Fonte: (HEMMER; ARCHELOS; HARTUNG, 2002).

1.3 Células-tronco mesenquimais (MSC)

As células-tronco mesenquimais (MSCs – *Mesenchymal Stromal Cells*) são células não diferenciadas, multipotentes, com propriedades imunomodulatórias e regenerativas, tornando-as atraentes para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias (DOMINICI et al., 2006; LE BLANC; MOUGIAKAKOS, 2012). Essas células são caracterizadas por ter habilidade de aderir ao plástico de placas de cultura, por serem capazes de se diferenciar em diversas linhagens *in vivo* e *in vitro* como, condrócitos, osteócitos e adipócitos e por apresentarem o fenótipo CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺/CD34⁻, CD45⁻, CD14⁻, CD19⁻, HLADR⁻ e CD115⁻ (DOMINICI et al., 2006). Foram primeiramente isoladas da medula óssea variando entre 0,001% a 0,01% das células nucleadas (FRIEDENSTEIN et al., 1974). Hoje sabe-se que tal população está amplamente presente pelo corpo, sendo também encontrada na pele (TOMA

et al., 2005), tecido adiposo (KIM et al., 2007), coração (BI et al., 2007), placenta (CHANG et al., 2006), no sangue menstrual, no endométrio e nas tubas de falópio (JAZEDJE et al., 2009).

As MSCs vêm sendo utilizadas como alternativa terapêutica em diversos modelos inflamatórios, inclusive durante a neuroinflamação, uma vez que são capazes de modular o sistema imune nas lesões do SNC e aumentar a remielinização e o reparo (AULETTA et al., 2012). Todavia, os mecanismos precisos da imunomodulação na EM ainda permanecem obscuros. Em um artigo anterior, demonstramos que fatores anti-inflamatórios importantes podem estar envolvidos, como IL-10, IL-27, IDO e T reguladores (Tregs) (PERON et al., 2012). De fato, são vários os mecanismos inibitórios das MSCs, os quais podem agir sobre diferentes tipos de células imunes, como linfócitos B e T, NK e células dendríticas (Fig. 4).

Os linfócitos T são as células principais nas autoimunidades e, neste contexto, já se demonstrou que as MSCs atuam inibindo a proliferação destas na fase G₀/G₁ (DI NICOLA et al., 2002). As células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs – *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) suprimem as citocinas produzidas por linfócitos Th1 (IFN- γ e TNF- α) e Th17 (IL-17), mudando o perfil da resposta para o tipo Th2 aumentando a produção de IL-4 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Além disso, as MSCs podem afetar a produção de Tregs, uma vez que a co-cultura de MSCs com células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) induz a geração desta população. Essas podem também suprimir a proliferação e função citotóxica dos linfócitos CTLs (*Cytotoxic T Lymphocytes*) (GHANNAM et al., 2010), e principalmente através de mediadores solúveis como IL-10, TGF- β , prostaglandina E2 (PGE2). Além disso, são capazes de expressar indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima conhecida por catalisar a oxidação do triptofano á N-formil-quinurenina (NFK), resultando a inibição da linfoproliferação (ENGLISH et al., 2009; GIESEKE et al., 2007). De forma interessante, trabalhos em *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a IDO tem capacidade de diferenciar linfócitos T naive para Tregs (FALLARINO et al., 2006).

As MSCs também exercem efeito através da modulação de células dendríticas, induzindo a diferenciação de Tregs secretoras de IL-10 ou induzindo anergia de linfócitos T (MENGES et al., 2002). Além disso, a presença de fatores solúveis como PGE2, IL-6 e fator

estimulador de colônia de monócitos (M-CSF – *Monocyte Colony Stimulating Factor*) podem inibir a secreção de IL-12 pelas células dendríticas, uma citocina essencial para a sobrevivência de linfócitos Th1 (SPAGGIARI et al., 2009). Quanto às NKs (*Natural Killer*), as MSCs inibem sua proliferação e produção de citocinas (POGGI et al., 2005), assim como de linfócitos B (GLENNIE et al., 2005). Já quanto aos macrófagos, as MSCs podem aumentar a produção de IL-10 e diminuir IL-12 e TNF- α (GHARIBI et al., 2015). Quanto às células residentes do SNC, demonstrou-se que as MSCs podem agir em progenitores estimulando ou inibindo a produção de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (ZHANG et al., 2009).

Figura 8- Efeitos imunomodulatórios das MSCs conhecidos. As MSCs possuem efeitos imunomodulatórios em diferentes células do sistema imune, entre elas, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T regs, células dendríticas, macrófagos, linfócitos B, células NK e progenitores de células do SNC.

Fonte: (GLENNIE et al., 2005).

Além dos estudos *in vitro*, a capacidade supressora das MSCs tem sido também amplamente estudada em modelos experimentais *in vivo*. Células-tronco mesenquimais

derivadas da gengiva (GMSC - *Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cell*) retiradas da cavidade oral são capazes, por exemplo, de suprimir o infiltrado inflamatório, a produção de citocinas inflamatórias, além de aumentar a infiltração de células Tregs e induzir a expressão de IDO e IL-10 no modelo experimental de colite (GHARIBI et al., 2015). Já as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AD-MSCs – *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*) são capazes de diminuir a gravidade da artrite em animais experimentais por também aumentar a produção de IL-10 no local da inflamação e favorecendo a infiltração de Tregs (GONZALES et al., 2009). Além disso, as AD-MSCs também diminuem a gravidade da sepsis suprimindo o infiltrado inflamatório e a produção de mediadores inflamatórios em diversos órgãos-alvo (GONZALES-REY et al., 2009). Ademais, a infusão intravenosa de MSCs bloqueia o desenvolvimento da uveíte experimental autoimune (EAU – *Experimental Autoimmune Uveitis*) aumentando células MHC classe II^{low} Ly6G⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ que suprimem a proliferação de T CD4⁺ uveitogênicos e a diferenciação de células Th1 e Th17, além de induzir a apoptose de linfócitos T CD4⁺. De forma interessante, demonstrou-se que isso ocorre de forma dependente do recrutamento de MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) aos sítios inflamatórios de maneira dependente de CCL-2 (LEE et al., 2015).

Nosso grupo também já demonstrou anteriormente que as células-tronco mesenquimais derivadas do endométrio humano (hedMSC – *Human Endometrial-Derived Mesenchymal Stem Cells*) são capazes de suprimir os sintomas da EAE, diminuindo o infiltrado de células mononucleares no SNC, incluindo células Th1 e Th17.

Sendo assim, sabendo que o útero tem a mesma origem embrionária que as tubas uterinas e que ambos são ricos em células-tronco mesenquimais (meMSCs – *Murine Endometrial Mesenchymal Stromal Cells*) caracterizadas pelos mesmos marcadores de superfície, tivemos como objetivo no presente trabalho avaliar a capacidade imunomoduladora das meMSCs utilizando o modelo de EAE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo caracterizar as células-tronco mesenquimais endometriais murinas (meMSCs) além de investigar sua capacidade reguladora utilizando-a como tratamento no modelo de encefalomielite experimental autoimune.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a obtenção e caracterizar fenotipicamente as meMSC;
- Avaliar sua capacidade de diferenciação em outros tecidos;
- Avaliar a progressão da EAE em animais tratados ou não com meMSCs;
- Caracterizar a celularidade em baço e linfonodos de animais com EAE tratados com meMSCs;
- Avaliar o estado funcional de macrófagos e células dendríticas de baço e linfonodos de animais com EAE tratados com meMSCs;
- Avaliar o estado funcional de linfócitos T CD4 e CD8 de no baço, linfonodos e SNC de animais com EAE tratados com meMSCs.
- Caracterizar o perfil de citocinas produzidas no SNC de animais com EAE tratados com meMSCs;
- Avaliar o estado de ativação de células da micróglia e macrófagos infiltrantes no SNC de animais com EAE e tratados com meMSCs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmea da linhagem C57BL/6 selvagens (WT), de 2-3 meses de idade mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os protocolos foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta mesma instituição.

3.2 Histologia

Para caracterização histológica das tubas uterinas e do útero foram utilizados animais C57BL/6 WT (n=2). Além disso, realizamos a análise histologia nas medulas espinhais dos animais com EAE tratados ou não com as meMSCs (n=10). Os órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% (Sigma - Aldrich) durante 72 horas a 4 °C. Em seguida, foram lavados em água corrente por 10 minutos e a desidratação foi realizada pela imersão dos órgãos em concentrações crescentes de álcool etanol durante 1 hora cada, iniciando pela concentração de 70%, 80%, 90% e por último, duas vezes em etanol 100%. A partir disso, os órgãos foram imersos em xilol duas vezes durante 1 hora cada e os tecidos foram incluídos em parafina líquida a 60 °C (Histotec – Merck Chemicals) durante 16 horas. Após polimerização da parafina, os órgãos foram cortados em aproximadamente 5 µm em micrótomo automático Leica RM2165 (leica, Welzear, Alemanha). Os cortes foram assentados em lâminas histológicas e deixadas a 60 °C por 16 horas para melhor fixação das amostras e evaporação da parafina.

3.2.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina

As lâminas histológicas foram desparafinizadas com imersão em xilol duas vezes durante 1 hora cada, seguido da hidratação do tecido, iniciando pela imersão em álcool etanol 100%, 95% e 70% por 10 minutos cada e por uma imersão em água destilada durante 5 minutos. A coloração iniciou-se com a Hematoxilina de Harris (Sigma - Aldrich) por 1

minuto seguido de 10 minutos de água corrente, assim removendo o excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram coradas com Eosina (Sigma - Aldrich) por 3 minutos e desidratadas com etanol 95% e duas imersões de 5 minutos cada de etanol 100%. As fotos foram tiradas em aumento de 4 x, 10 x, e 20 x em microscópio de varredura (Leo 435 VP – Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2.2 Imunohistoquímica

As lâminas foram desparafinizadas com imersão em xilol duas vezes durante 10 minutos cada, etanol-xilol (1:1), seguido da hidratação do tecido, iniciando pela imersão em álcool etanol 100%, 90% e 70% por 3 minutos cada e por uma imersão em água destilada durante 3 minutos. O desmascaramento dos sítios antigênicos foi realizado em forno micro-ondas com o tampão citrato a 10% diluído em PBS (pH 6,0) 3 vezes de 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando água oxigenada 3% (Merck) diluída em metanol (Merck) durante 5 minutos, com proteção da luz. Logo após, realizou-se a lavagem em solução PBS 0,1M contendo 0,05% de Tween, durante 5 minutos. Para evitar ligação inespecífica, as lâminas foram incubadas com PBS contendo 2% de soro albumina bovina (BSA) a 60 °C por 30 minutos. Em seguida, foi incubado com anticorpos primários anti-PCNA3 e anti-vimentina na concentração de 200 µg/mL (Santa Cruz Biotecnologia, CA, USA) utilizados na diluição de 1:50 em PBS 0,1 M a 4 °C. Após 16 horas de incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 0,1M contendo 0,05% de Tween por 5 minutos cada e incubadas com *Advanced HRP Link* (DAKO, CA, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente e lavadas novamente 3 vezes. Posteriormente foram incubadas com *Advanced HRP Enzyme* (DAKO, CA, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas 3 vezes. A identificação das amostras marcadas com os anticorpos primários foi realizada utilizando o cromógeno diaminobenzina 3,3' (DAB –DAKO) na ausência de luz, em temperatura ambiente durante 2 minutos e lavadas por mais 3 vezes. Para melhor visualização, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 5 segundos e em seguida imersas em água destilada por 5 minutos. Após, os cortes histológicos foram imersos 3 vezes de 5 segundos em água amoniacal a 0,5% (Merck) e 1 vez em água destilada por 5 segundos. Para finalizar, as amostras foram desidratadas, usando uma concentração

crescente de álcool etanol, iniciando com 70%, 90% e 100% durante 30 segundos cada imersão, seguido de xilol-etanol (1:1) por 5 segundos e de xilol por 10 minutos. As fotos foram tiradas em aumento de 4 x, 10 x e 20 x em microscópio de varredura (Leo 435 VP – Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2.3 Coloração por Luxol Fast Blue

As lâminas foram desparafinizadas com imersão em xilol duas vezes durante 1 hora cada, seguido da hidratação do tecido, iniciando pela imersão em álcool etanol 100%, 95% e 70% por 10 minutos cada e por uma imersão em água destilada durante 5 minutos. A coloração iniciou-se com solução Luxol Fast Blue (MBS - 0,1 g em etanol 95%) *overnight* em estufa a 56 °C. O excesso de corante foi retirado com álcool 95% no dia seguinte e, posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e diferenciadas em solução de carbonato de lítio a 0,05 % por 30 segundos. As fotos foram tiradas em aumento de 4 x, 10 x, e 20 x em microscópio de varredura (Leo 435 VP – Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.3 Identificação das fases do ciclo estral

A identificação das fases do ciclo estral de camundongos fêmea C57BL/6 WT é realizada através da análise visual da abertura vaginal. Além disso, a vagina foi lavada com 20 µL de PBS (1 x) estéril, dos quais 10 µL foram diluídos (1:20) para análise por citometria de fluxo e com os 10 µL restantes foi realizada a citologia do lavado vaginal, corada com o corante panótico, para avaliarmos diferenças entre as fases estrais de acordo com a morfologia das populações celulares presentes em cada fase.

3.4 Obtenção e cultura de meMSC

As tubas uterinas e o útero foram extraídos de animais C57BL/6 WT e o protocolo de obtenção dessas células foi adaptado (JAZEDJE et al., 2009). Esses órgãos foram lavados quatro vezes com PBS estéril 1 x acrescido de 3% penicilina (100 IU/mL, *Invitrogen*) e estreptomicina (100 IU/mL, *Invitrogen*) e em seguida, cortados com bisturi estéril e incubados em tubo de 15 mL com 5 mL de tripsina (1 x, LGC) durante 45 minutos à 37 °C em banho-maria. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado com uma pipeta

Pasteur, lavado com 7 mL de DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB em um tubo de 15 mL e centrifugado a 400 g por 5 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e mantidas em garrafas de cultura (25 cm²) em um ambiente de 5% de CO₂ e a 37 °C. O meio de cultura usado para a expansão foi trocado após 72 horas de cultivo e duas vezes por semana subsequentemente. Após expansão, as meMSCs obtidas foram cultivadas e utilizadas como desejado.

3.5 Diferenciação das meMSCs

Para avaliar as propriedades de diferenciação das meMSCs, as células aderidas foram submetidas a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica usando o kit *Invitrogen Stem Pro Differentiation* (A1007101, A1007001 e A1007201) conforme protocolo descrito pelo fabricante.

3.5.1 Diferenciação Adipogênica

Células foram mantidas em cultura com o meio de diferenciação por duas semanas. Após a utilização do kit para diferenciação em adipócitos, as células no dia 14 foram obtidas e avaliadas quanto a acumulação intracelular de vacúolos ricos em lipídios corados com *oil red O* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para a coloração com *oil red O*, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 30 minutos, lavadas e coradas com a solução de *oil red O*, 16% por 20 minutos.

3.5.2 Diferenciação Condrogênica

Após duas semanas de cultivo em meio de diferenciação as células em monocamada foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e coradas com *Toluidine Blue* para detecção de mucopolissacarídeos da matriz extracelular. O corante foi preparado pela adição de 1% de *Toluidine Blue* dissolvido em água destilada, contendo 1% de borato de sódio, e em seguida foi filtrado. O corante foi adicionado em cada poço da cultura por 2 minutos, lavados com água destilada e deixados para secagem natural.

3.5.3 Diferenciação Osteogênica

A diferenciação osteogênica foi mostrada pela formação de áreas positivas para hidroxiapatita de cálcio no dia 21. Depois de duas lavagens com PBS e uma lavagem com água destilada, as células foram incubadas com 1% nitrato de prata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) sobre a luz ultravioleta (UV) por 45 minutos. As células foram incubadas com 3% tiosulfato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 5 minutos. A coloração foi finalizada com o corante Van Gieson. A acumulação de cálcio é indicada pela cor preta.

3.6 Extrações de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A medula espinhal de animais com EAE tratados ou não com as meMSC foi dissociada (GentleMACS Dissociator, Myltenyi Biotec) e o mRNA da medula espinhal e das meMSC estimuladas *in vitro* foi extraído pela adição de 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, EUA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A essa solução foram adicionados 500 µL de clorofórmio que promoveu a separação de RNA, DNA e proteínas, após centrifugação a 12000 rcf por 15 minutos. A porção superior (transparente, que contém RNA) foi cuidadosamente retirada e transferida para outro tubo onde foi adicionado 500 µL de isopropanol. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, centrifugada a 12000 rcf por 10 minutos e sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Ao *pellet* obtido (nem sempre visível), foi adicionado 1 mL etanol 75% e centrifugado a 7600 rcf por 5 minutos a 4 °C e repetiu esse processo 3 vezes. Após a última lavagem, o etanol foi retirado e o tubo mantido invertido sobre a bancada até a secagem total do *pellet*. Finalmente, 25 µL de água ultrapura foram adicionados. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260/280nm (NanoDrop 2000, ThermoFisher). Para a síntese de cDNA, foi realizada uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 2 µg de RNA diluídos em 5 µL foram adicionados a 5 µL de mix (2 µL RT buffer, 2 µL de RT random primers, 1 µL de multiscribe e 0,8 µL de dNTPs e 4,2 µL de água ultrapura). A mistura foi levada ao termociclador (QuantStudio3, Applied Biosystems) e submetida a três ciclos (25 °C por 10 minutos; 37 °C por 120 minutos; e 85 °C por 5 minutos). Decorridos os ciclos, foram adicionados 80 µL de água ultrapura.

3.7 Quantificação por PCR em Tempo Real

A partir do cDNA obtido, foi avaliada a expressão de mRNA de moléculas envolvidas na inflamação e de células Th1, Th17 e Tr1 por PCR em tempo real (qPCR). A cada reação de PCR, foi adicionado 0,5 µL de 20 x *TaqMan® gene expression assay*, 4,5 µL de 2 x *TaqMan® gene expression assay master mix*, 5 µL de amostra de cDNA. As soluções foram levadas ao aparelho *QuantStudio3* (Applied Biosystems) e submetidas a diferentes estágios (50 °C por 2 minutos; 95 °C por 2 minutos; 95 °C por segundos e 60 °C por 1 minutos x 40 repetições). As curvas foram normalizadas pela expressão da β -actina. A expressão gênica foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$, e ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo. Abaixo segue a lista dos primers *TaqMan®*, que foram utilizados nos experimentos de PCR em tempo real:

Ido1	Mm01218005_g1
Il6	Mm00446190_m1
Bdnf	Mm00446190_m1
Tgfb1	Mm01178820_m1
Foxp3	Mm00475162_m1
Il10	Mm00475162_m1
Rorc	Mm01261022_m1
Il17a	Mm00439618_m1
Tbx21	Mm00450960_m1
Ifng	Mm01168134_m1
Ifnb	Mm01168134_m1
Il27	Mm00461162_m1
Actb	Mm0073933_m1

3.8 Indução de EAE e tratamento com as meMSCs

Os animais C57BL/6 WT foram imunizados por via subcutânea com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ emulsificados em CFA (*Complete Freund Adjuvant*) (v/v) em 100 µg de *M. tuberculosis* H37. Adicionalmente, foram dadas nos períodos 0 e 48 horas após imunização, 0,2 µg de toxina de *Bordetella pertussis* via intraperitoneal. Os animais foram acompanhados diariamente e o grau de doença foi atribuído da seguinte forma: 0 – sem doença, 1 – perda do tônus da cauda, 2 – patas traseiras parcialmente paralisadas, 3 – paralisia total das patas traseiras, 4 – paralisia total das patas traseiras com paralisia parcial das patas dianteiras, 5 – paralisia completa ou morte. As meMSCs foram removidas das garrafas de culturas por tripsinização, lavadas e contadas. Em seguida, foram injetadas em uma dose de 1×10^6 células via intra-peritoneal um dia antes da imunização ou em duas doses de 1×10^6 células via intra-peritoneal aos dias 0 e 10 pós-imunização. Os animais foram então acompanhados diariamente.

3.9 Obtenção de células do sistema nervoso central

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ no pico da doença. O cérebro e a medula espinhal foram extraídos e colocados em tubo cônico de 50 mL estéreis e incubados com 2,5 mg/mL colagenase D em HBSS com cálcio e magnésio durante 45 minutos a 37 °C. Após esse período, a reação da enzimática foi parada com a 15 mL de HBSS 1 x sem cálcio e magnésio acrescido de 0,5 mM de EDTA e então as amostras foram processadas em *cell strainers* e centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspensionado em 6 mL de Percoll a 25%. Essa suspensão foi adicionada lentamente sobre 2 mL de Percoll 75% em tubos de 15 mL e centrifugada por 20 minutos a 900 g 22 °C com freio desligado. O sobrenadante foi descartado e o anel contendo células mononucleares foi armazenado e lavado com 15 mL de HBSS 1x sem cálcio e sem magnésio e centrifugado por 5 minutos, 400 g a 4 °C. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI com 10% SBF e 1% de penicilina/estreptomicina, contado e semeado para CBA, citometria de fluxo com marcação de superfície e marcação intracelular.

3.10 Obtenção de células do baço e dos linfonodos

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. O baço foi extraído no 7º dia pós-imunização e no pico da doença e os linfonodos inguinais, subaxilares e periaórticos foram extraídos no 7º dia pós-imunização, ambos processados em *cell strainers* e centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* dos linfonodos foi ressuspensionado em meio RPMI com 10% SBF e 1% de penicilina/estreptomicina e semeado para CBA, citometria de fluxo com marcação intracelular e marcação de superfície. Ao *pellet* dos esplenócitos totais foi adicionado 1 mL de tampão de lise de hemácias por 2 minutos e em seguida adicionado 15 mL de meio RPMI e centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4 °C. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em meio RPMI com 10% SBF e 1% de penicilina/estreptomicina e semeado para CBA, citometria de fluxo com marcação intracelular e marcação de superfície.

3.11 Co-cultura de meMSC e linfócitos T CD4⁺

Os animais 2D2 KI foram sacrificados por deslocamento da cervical e o baço e os linfonodos inguinais, subaxilares e periaórticos foram extraídos e ambos processados em *cell strainers* e centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* dos linfonodos foi ressuspensionado em meio RPMI com 3% SBF e 3% de penicilina/estreptomicina. Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados por *cell sorting* no citômetro de fluxo FACS ARIA II (BD Biosciences). Em seguida, foram cultivados na presença ou ausência de meMSC (proporção 1 meMSC para 10 linfócitos). As células foram estimuladas ou não com α -CD3/ α -CD28 (2 μ g/mL) ou MOG₃₅₋₅₅ (50 μ g/mL). Todas as condições foram realizadas em triplicata. Após 5 dias o sobrenadante foi coletado.

3.12 Análises por citometria de fluxo

3.12.1 Dosagem de citocinas

Com sobrenadante das meMSC estimuladas *in vitro*, como dito anteriormente, foi para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA.. As células mononucleadas do SNC, os esplenócitos totais e as células dos linfonodos foram plaqueadas 1 x 10⁶ células/poço e estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (1 μ g/mL); α -CD3 (1 μ g/mL) + α -CD28 (1

µg/mL). Após 72 horas de cultivo o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 foi utilizado o *CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* da (BD Pharmingen®) conforme instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no aparelho de citometria de fluxo FACS Accuri BD® sendo adquiridos 2100 eventos.

3.12.2 Avaliação de células Th1, Th17 e Tr1

As células dos linfonodos extraídas no 7º dia pós-imunização, os esplenócitos totais extraídos no 7º dia pós-imunização e no pico da doença e as células mononucleadas do SNC extraídas no pico da doença foram plaqueadas 1×10^6 células/poço e estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (1 µg/mL) overnight. Após esse período, as células foram estimuladas ou não PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µg/mL) e todas as células foram acrescidas de brefeldina (1000 x). Posteriormente aos estímulos, as células foram bloqueadas com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 da *eBioscience*® (*Fc block*). Após, as células foram incubadas com anti-mouse CD4 FITC e CD8 PE-Cy7 durante 30 minutos a 4 °C. Para a avaliação das citocinas intracelulares com o objetivo de caracterizar as populações de linfócitos T, as células foram ressuspendidas em 100 µL de Cytofix/Cytoperm kit (*eBioscience*®) e incubadas por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, foram lavadas com 100 µL de BD Perm/Wash™ e centrifugadas a 450 g a 4 °C por 5 minutos. Após este processo, as células foram incubadas com o coquetel de anticorpos desejados (anti-IFN-γ PercP-Cy5.5, anti-IL-17 PE, anti-IL-10 APC) por 20 minutos. Em seguida, as células foram novamente lavadas, centrifugadas a 450 g 4 °C por 5 minutos e ressuspendidas em 200 µL de MACS buffer. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo 10. Como estratégia de gate na marcação intracelular para análise de linfócitos, iniciamos demarcando os *singlets*, e em seguida escolhendo as células mononucleadas (Fig. 5A) para o SNC e linfócitos (Fig. 5B) para baço e linfonodos pelos parâmetros de tamanho por granulosidade. Dentro das células mononucleadas ou dos linfócitos visualizamos as células positivas para CD4 e CD8 e dentro de cada uma dessas populações, observamos a produção de IFN-γ, IL-17A e IL-10, caracterizando os linfócitos.

3.12.3 Análise fenotípica das meMSC

As meMSC foram removidas das placas por tripsinização, lavadas e bloqueadas durante 20 minutos com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 da *eBioscience*® (*Fc block*) a 4 °C. Em seguida, foram lavadas e incubadas durante 20 minutos a 4 °C com anticorpos anti-mouse conjugados específicos para CD14, CD29, CD31, CD44, CD45, CD73, CD90, MHC II (I-A/I-E) e MHC I (H-2Hd/H-2Dd). Em seguida, as células foram novamente lavadas, centrifugadas a 450 g 4 °C por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de MACS buffer. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo BD Canto II (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo 10.

3.12.4 Resposta proliferativa *in vitro*

Os linfonodos foram extraídos no 7º dia pós-imunização, processadas em *cell strainer* e lavadas com HBSS 1 x sem cálcio e magnésio sem suplemento. Em seguida, foram ressuspensas em 1 mL de HBSS 1x sem cálcio e magnésio sem suplemento na presença de CFSE durante 15 minutos em banho-maria a 37 °C. Foram adicionadas 9 mL meio de cultura suplementado com 10% de SBF e incubado mais 5 minutos em banho-maria a 37 °C. As células (1×10^6) marcadas foram plaqueadas e estimuladas com estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) ou α -CD3/ α -CD28 (2 µg/mL). Após 96 horas as células foram coletadas e marcadas com CD4 PE e CD8 PercP para análise por citometria de fluxo. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo BD Canto II (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo 10.

3.12.5 Avaliação de moléculas de ativação em células dendríticas, macrófagos e microglia.

As células dos linfonodos extraídas no 7º dia pós-imunização e as células mononucleadas do SNC extraídas no pico da doença foram plaqueadas 1×10^6 células/poço. Posteriormente, as células foram bloqueadas com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 da eBioscience® (Fc block). Após, as células foram incubadas com anti-mouse CD11b APC, F4/80

Brilliant Violet 421, CD11c APC-Cy7 , MHC II PE, CD80 PercP-Cy5.5, CD86 FITC durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas, centrifugadas a 450 g 4 °C por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de paraformaldeído 1%. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo 10. Como estratégia de gate para análise de moléculas de ativação, iniciamos demarcando os *singlets*, e em seguida escolhendo as células mononucleadas (Fig. 6A) para o SNC e linfócitos (Fig. 6B) para baço e linfonodos pelos parâmetros de tamanho por granulosidade. Dentro linfócitos visualizamos as células positivas para CD11c (células dendríticas) e CD11b e F4/80, e dentro de cada uma dessas populações, observamos a expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC II (Fig. 6B). Dentro das células mononucleadas visualizamos as células positivas para CD11b e com expressão baixa (microglia ativada) e alta (macrófagos infiltrantes) de CD45, e dentro de cada uma dessas populações, observamos a expressão das moléculas CD86 e MHC II (Fig. 6A).

Figura 6 – Estratégia de gate para análise da expressão de moléculas de ativação de células dendríticas, macrófagos e microglia. Estratégia de gate utilizada em células dos linfonodos extraídos no 7º dia pós-imunização (B) e as células mononucleares do SNC extraídos no pico da doença (A) para análise da expressão de moléculas de ativação.

3.13 Análises estatísticas.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *Graphpad Prism* (*Graphpad Software Incorporation*) versão 6. As diferenças entre as médias dos resultados que foram obtidos nos experimentos foram determinadas pelo *Unpaired t test Student* ou análise de variância (ANOVA), dependendo do número de variáveis. T test ou ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e caracterização das meMSC

Inicialmente realizamos a histologia da tuba uterina (Fig. 7A) e do útero (Fig. 7B), órgãos dos quais isolamos as meMSC, a fim de conhecer melhor suas estruturas. Podemos observar que ambos os órgãos são formados pelo perimétrio, miométrio e endométrio. A camada mais externa é formada pelo mesotélio, constituída por uma camada serosa e tecido conjuntivo, conhecida como perimétrio. O miométrio, por sua vez, é a camada subjacente de musculatura lisa, responsável pelas contrações do músculo no parto e na menstruação. E, por fim, o endométrio é a camada mais interna, rica em glândulas secretoras de muco e onde ocorre a implantação embrionária. Além disso, essa camada é dividida em camada basal e funcional, sendo a basal encontrada em contato com o miométrio e a funcional voltada para o lúmen (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Também realizamos imunohistoquímica de ambos, sendo observadas células positivas para vimentina e PCNA3, marcadores de citoesqueleto e de ciclo celular, respectivamente, (Fig. 8A e 8B), e descritos por caracterizar as células tronco mesenquimais.

Após conseguirmos caracterizar e conhecer as estruturas da tuba uterina e do útero de camundongos fêmea e sabendo que esses animais também possuem fases em seu ciclo estral, identificamos essas fases a fim de observar possíveis diferenças na celularidade e facilitar a obtenção das meMSC. O ciclo estral de camundongos fêmea consiste em: proestro, estro, metaestro e diestro, sendo que o ciclo completo leva em torno de 4-5 dias (BYERS et al, 2012). Assim, reparamos que em cada fase estral a vagina se encontra em formas distintas (Fig. 9A). Na fase proestro observamos a vagina com hiperemia e edema, enquanto que na fase estro há um aumento do edema e presença de muco copioso que propicia a monta com complacência. Na fase metaestro há presença de pouco muco e palidez, e para finalizar o ciclo, durante a diestro podemos observá-la pálida e seca. Para distinguirmos melhor cada fase do ciclo estral, realizamos o lavado vaginal e posterior análise por citologia (Fig. 9B) e citometria de fluxo (Fig. 9D). Pudemos identificar diferenças significativas na celularidade entre elas, sendo a fase proestro caracterizada pela grande quantidade de células epiteliais nucleadas e algumas células epiteliais cornificadas. Já a fase

estro apresentou células epiteliais cornificadas em menor quantidade. A fase metaestro, caracterizou-se por células epiteliais cornificadas juntamente com alguns leucócitos, enquanto a fase diestro, por sua vez, apresentou uma predominância destes leucócitos.

Após a caracterização das fases estrais, obtivemos as meMSC em cada uma delas (Fig. 9C e 10), com o objetivo de observar diferenças em rendimento e viabilidade. Ao avaliarmos o rendimento total de células após o processamento dos órgãos, a fase estro apresentou o maior número de células em comparação com as outras fases (Fig. 10B). Nossos resultados também mostraram que as amostras obtidas em proestro, metaestro e diestro, tiveram um crescimento mais lento, tornando-se confluentes somente entre o 20º e 24º dia de cultivo. Porém, as meMSC obtidas na fase estro tiveram um crescimento mais rápido, tornando-se confluentes já ao 13º dia de cultivo (Fig. 10A). Portanto, escolhemos trabalhar com as meMSC retiradas na fase estro.

As células-tronco mesenquimais são conhecidas por serem multipotentes com morfologia alongada, possuírem capacidade de se diferenciar nas linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica e por apresentarem um fenótipo bem estabelecido. Sabendo disso, o próximo passo foi comprovar que as células que obtivemos eram as de nosso interesse. Para isso, primeiramente vimos que as células quando cultivadas se apresentavam alongadas, e em seguida realizamos a diferenciação das meMSC obtidas na fase estro nas linhagens citadas (Fig. 11). Nós constatamos que, embora as células diferenciadas em adipócitos não estivessem confluentes, houve um acúmulo intracelular de vacúolos ricos em lipídeos que são indicados pela cor vermelha (Fig. 11C e 11D), não observado na cultura controle (Fig. 11A e 11B). Para mais, notamos a presença de matriz extracelular de mucopolissacarídeo, caracterizando a diferenciação em condrócitos (Fig. 11G e 11H), diferentemente da cultura controle (Fig. 11E e 11F). E ao realizamos a diferenciação osteogênica, verificamos um acúmulo de cálcio nas células diferenciadas indicado pela cor preta (Fig. 11K e 11L) não sendo indicado nas células não diferenciadas (Fig. 11I e 11J).

Por último, realizamos a caracterização fenotípica dessas culturas. Podemos observar que, de acordo com a literatura, as mesmas apresentaram uma alta expressão de CD29,

CD73, CD90 e MHC de classe I, sendo negativas para CD14, CD31, CD45 e MHC de classe II (Fig 12).

Figura 7 - Histologia da Tuba Uterina e Útero. Identificação das estruturas perimétrio, miométrio e endométrio da tuba uterina (A) e útero (B) de camundongos fêmea C57BL/6 WT (n=2) através de corte histológico com coloração de Hematoxilina e Eosina. Imagens à esquerda estão em aumento de 20 x; Imagens à direita estão em aumento de 10 x.

Figura 8 - Ensaios Imunohistoquímicos da Tuba Uterina e Útero. A Tuba Uterina (A) e o Útero (B) (n=2) apresentaram marcação positiva para Vimentina, um marcador de citoesqueleto e PCNA3, um marcador de ciclo celular e não apresentaram marcação no controle negativo. Imagens à esquerda estão em aumento de 4 x; Imagens ao meio estão em aumento de 10 x; Imagens à direita estão em aumento de 20 x.

Figura 9 - Caracterização das Fases Estrais. A caracterização foi realizada através da A) abertura vaginal de camundongos fêmeas C57BL/6 WT e através do lavado vaginal posteriormente analisados por D) citometria de fluxo e B) citologia com o corante panótico. Identificamos as fases Proestro; Estro; Metaestro; Diestro. CEC = células epiteliais; M = células mortas; L = leucócitos; Seta preta = células epiteliais cornificadas; Seta branca = células epiteliais nucleadas; Círculo = leucócitos. C) As meMSC foram cultivadas em cada fase estral até o 20º dia de cultivo, onde tornarem-se confluentes. * = meMSC obtidas na fase estro tornam-se confluentes no 13º dia de cultivo. B) Imagens aumento de 10 x. C) Imagens em aumento de 4 x; n=5.

Figura 10 - Rendimento de meMSC nas Fases Estrais. As tubas uterinas e o útero de animais C57BL/6 WT (n=2) foram extraídos na fase proestro; estro; metaestro; e diestro. Os órgãos extraídos foram processados para obtenção de meMSC e as células cultivadas em garrafas de 25 cm² nas mesmas condições, afim de avaliar o seu rendimento em cada uma das fases estrais. As meMSC obtidas nas fases proestro, metaestro e diestro tiveram um crescimento mais lento, tornando-se confluentes ao 20º dia de cultivo. Porém durante a fase estro, tornam-se confluentes no 13º dia de cultivo. A) Imagens do crescimento da cultura em diferentes dias. * = meMSC fase estro no 13º dia de cultivo. # = Imagens em aumento de 4 x. B) Contagem do número de células obtidas no processamento dos órgãos.

B)

Fases estrais	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Rendimento	2,9 x 10 ⁶ cel/mL	3,9 x 10 ⁶ cel/mL	3,4 x 10 ⁶ cel/mL	3,1 x 10 ⁶ cel/mL

Figura 11 - Diferenciação de multilinhagens *in vitro*. A-D) diferenciação adipogênica – coloração com Oil Red. A) e B) representam o controle; C) e D) a diferenciação adipogênica caracterizada pela acumulação intracelular de vacúolos ricos em lipídeo visualizados em vermelho. E-H) diferenciação condrogênica – coloração com Toluidine Blue. E) e F) representam o controle; G) e H) a diferenciação condrogênica caracterizada pela matriz extracelular mucopolissacarídeo. I-L) diferenciação osteogênica – coloração com Alizarin Red. I) e J) representam o controle; K) e L) a diferenciação osteogênica caracterizada pelo acúmulo de cálcio indicado pela cor preta. Imagens em aumento de 10 x; n=4.

Figura 12 - Caracterização fenotípica das meMSC. As meMSC obtidas na fase proestro de camundongos fêmeas C57BL/6 WT entre as passagens 2 e 4, foram submetidas a análise por citometria de fluxo para verificar a expressão dos marcadores CD29, CD31, MHC II (I-A/I-E), CD14, CD90, MHC I (H-2Hd/H-2Dd), CD45, CD44 e CD73 representados em histograma vermelho. O controle isótipo é mostrado em histograma azul.

4.2 O tratamento com as meMSC é capaz de atrasar o aparecimento dos sinais clínicos da EAE

A fim de descobrir se as meMSC possuem potencial no tratamento de animais com EAE, optamos realizá-los ao dia da imunização, com o objetivo de agirem na monta da resposta imune nos órgãos linfoides secundário e, também, ao 10º dia após a imunização, uma vez que possam rumar ao SNC e, assim, agir *in situ* (Fig. 13A). Ao acompanhar diariamente os animais com EAE tratados ou não, podemos notar que o escore clínico, entre os dias 11º e 17º pós-imunização, foi menor nos animais tratados com meMSCs (Fig. 13B).

Figura 13 - Escore clínico de animais com EAE tratados ou não com meMSC. Camundongos fêmea C57BL/6 WT foram imunizados com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ de acordo com os materiais e métodos e no mesmo dia tratados com tratados com 1×10^6 células/animal. No 10º dia receberam uma segunda dose de meMSC (1×10^6 células/animal). n=5 para animais sacrificados no 7º dia pós imunização e n=10 para os animais sacrificados no pico da doença (A). O escore da doença foi avaliado diariamente (B). Dados representativos de dois experimentos independentes. T test *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,001.

4.3 Modulação desencadeada por meMSC na ativação da resposta imune adaptativa nos linfonodos

Uma vez que o desenvolvimento da EAE é dependente da ativação de clones autorreativos específicos para MOG₃₅₋₅₅, principalmente subpopulações Th1 e Th17, e pela resposta imune adaptativa ser iniciada nos linfonodos, fomos verificar se as meMSC teriam a capacidade de agir sobre as células apresentadoras de antígenos ou diretamente em linfócitos T nos linfonodos de animais tratados ou não no 7º dia após imunização.

4.3.1 Efeitos das meMSC sobre a apresentação de antígenos.

Primeiramente avaliamos a expressão de moléculas de coestimuladoras em células dendríticas e macrófagos de linfonodos drenantes. Não observamos diferença em sua frequência e número absoluto entre os grupos (Fig 14A). Em seguida, observamos que não há diferença no número absoluto e frequência de células que expressam as moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, tampouco na expressão dessas moléculas quando avaliamos o MFI (Fig 14B).

Quanto aos macrófagos, que são células caracterizadas por serem positivas para a molécula de superfície CD11b, observamos o mesmo. Não há diferença quanto à frequência, número absoluto de macrófagos (Fig 15A) tampouco quanto à expressão de moléculas coestimuladoras e de MHC de classe II (Fig. 15B).

Figura 14 - As meMSC não são capazes de modular a expressão de moléculas de ativação em células dendríticas dos linfonodos no modelo de EAE na monta da resposta imune. As células dos linfonodos (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=5) com EAE tratados ou não com meMSC no 7º dia após imunização foram analisados quanto a frequência e o número absoluto de células dendríticas (A) e a expressão de moléculas de ativação CD86 e CD80 (B) por citometria de fluxo. MFI = Intensidade Mediana de Fluorescência. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05.

A)

B)

Figura 15 - As meMSC não são capazes de modular a expressão de moléculas de ativação em macrófagos dos linfonodos no modelo de EAE na monta da resposta imune. As células dos linfonodos (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=5) com EAE tratados ou não com meMSC no 7º dia após imunização foram analisados quanto a frequência e o número absoluto de macrófagos (A) e a expressão de moléculas de ativação MHC II, CD86 e CD80 (B) por citometria de fluxo. MFI = Intensidade Mediana de Fluorescência. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05.

A)

B)

4.3.2 Papel das meMSC nas subpopulações de linfócitos T.

Sabendo da importância de linfócitos T na imunopatogênese da EAE, nos atentamos em verificar as diferentes subpopulações geradas nos linfonodos. Pudemos perceber que há diminuição de linfócitos T CD4⁺ nos animais tratados com as meMSC (Fig. 16A), sendo que o perfil desses também é modulado, uma vez que o tratamento diminuiu os linfócitos Th1, caracterizados por produzir a citocina IFN- γ , assim como os linfócitos Th17 produtores de IL-17A. De forma interessante, observamos o aumento dos clones secretores de IL-10 apenas nas células não estimuladas *in vitro*, apesar de haver uma tendência a aumentar essa população em resposta ao antígeno específico no tratamento com as meMSC (Fig. 16B; 16C).

Dando continuidade, analisamos as citocinas secretadas pelas células totais dos linfonodos, o que ratificou os resultados acima, pois há um aumento na secreção de IL-10 e diminuição na IL-17A e IFN- γ no grupo tratado (Fig. 17). Ao avaliarmos a expressão gênica dos fatores de transcrição e citocinas características de algumas subpopulações de linfócitos T, não observamos diferença entre os grupos, entretanto, pode-se observar o aumento na expressão gênica da citocina IL-27 (Fig. 18).

Além disso, a citocina pró-inflamatória IL-6 pareceu diminuída e a IL-4, uma citocina característica da população Th2, aumentou com o tratamento (Fig. 17). Observamos também o aumento da secreção de IL-2 pelas células totais dos linfonodos tratados (Fig. 17), a despeito de não haver diferença na proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os grupos (Fig. 19).

Figura 16 - As meMSC são capazes de modular o perfil de linfócitos T CD4⁺ dos linfonodos durante o início da resposta imune no modelo de EAE. As células dos linfonodos inguinais, axilares e periaórticos (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=5) com EAE tratados ou não com meMSC no 7º dia após imunização foram estimulados ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) durante 12 horas e PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µg/mL) nas últimas 4 horas. Além disso, todos os grupos receberam brefeldina 1000 x nas últimas 4 horas. Após a incubação, foi analisada a frequência e o número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (A) e sua produção das citocinas IFN-γ, IL-17A e IL-10 (B) por citometria de fluxo representado pelo grupo estimulado com MOG₃₅₋₅₅, seguido dos gráficos representativos (C). Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Figura 17 - Análise do perfil de citocinas dos linfonodos de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a monta da resposta imune. Os linfonodos inguinais, axilares e periaórticos de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=5) com EAE tratados ou não com meMSC 7 dias após imunização foram processados e 1×10^6 de células/poço foram estimulados ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL). Após 96 horas o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001.

Figura 18 - Expressão gênica dos linfonodos de animais com EAE tratados ou não com meMSC na monta da resposta imune. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=5) foram imunizados com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ de acordo com os materiais e métodos e no mesmo dia tratados com tratados com 1×10^6 meMSC/animal. No 7º dia após imunização os linfonodos inguinais, axilares e periaórticos foram retirados e o mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica. Os dados foram normalizados com o gene da β -actina e comparados com o grupo controle. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística T test * $p < 0,05$.

Figura 19 - Proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos linfonodos de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante monta da resposta imune. Os linfonodos inguinais, axilares e periaórticos de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=5) com EAE tratados ou não com meMSC 7 dias após imunização foram processados, marcados com CFSE e 1 x 10⁶ de células/poço foram estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) ou α-CD3/α-CD28 (2 µg/mL). Após 96 horas as células foram coletadas e marcadas com CD4 e CD8 para análise por citometria de fluxo. Dados representativos de dois experimentos independentes. A análise estatística T test foi empregada.

4.4 Avaliação dos efeitos do tratamento com as meMSC em células residentes e infiltrantes do SNC

Após avaliarmos o perfil das células envolvidas na imunopatogênese da EAE no local e no período em que a resposta imune está sendo formada, fomos investigar a ativação de células residentes e as células autorreativas infiltrantes do SNC, responsáveis por provocar os sinais clínicos. Primeiramente, observamos que o tratamento com as meMSC foi capaz amenizar a desmielinização da medula espinhal (Fig. 20B), haja vista que também diminuiu o número total de células infiltrantes no SNC (Fig. 20A; 20C).

Figura 20 - As meMSC são capazes de reduzir a neuroinflamação e dano histopatológico. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) foram imunizados com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ de acordo com os materiais e métodos e no mesmo dia tratados com tratados com 1×10^6 meMSC/animal. No pico da doença, o SNC foi processado e o número total de células infiltrantes foram contadas (C). Além disso, a porção distal da medula espinhal de cada animal foi retirada e submetida a histologia pela coloração de Hematoxilina e Eosina (A) ou Luxol Fast Blue (B). Imagens em aumento de 20 x. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05

4.4.1 Papel das meMSC na infiltração de macrófagos e ativação da microglia

Seguidamente, fomos avaliar a ativação de macrófagos infiltrantes do SNC e de células da microglia, sendo que ambas são conhecidas por expressarem a molécula de superfície CD11b, entretanto, os macrófagos possuem alta expressão da molécula CD45 enquanto que a microglia a expressa em baixos níveis. A princípio, pudemos observar uma diminuição significativa de macrófagos e de células da microglia ativadas (Fig. 21A).

Ao compararmos os dois grupos quanto ao perfil de ativação de macrófagos infiltrantes, notamos que há uma diminuição no número de células que expressam MHC II e as que expressam CD86. Além disso, o MFI de MHC II e CD86 é menor em macrófagos infiltrantes do SNC nos animais tratados com as meMSC (Fig. 21B). Quando nos atentamos às células da microglia, embora não tenhamos obtido diferença na expressão de CD86, a quantidade de células da microglia que expressam MHC II é menor com o tratamento (Fig. 21C).

Figura 21 - As meMSC são capazes diminuir a infiltração de macrófagos e ativação da microglia no SNC no modelo de EAE. As células mononucleadas do SNC (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) com EAE tratados ou não com meMSC na doença foram analisados quanto a frequência e o número absoluto de macrófagos infiltrantes ($CD11b^+ CD45^{High}$) e microglia ($CD11b^+$ e $CD45^{Low}$) (A) e a expressão de moléculas de ativação MHC II e CD86 em macrófagos infiltrantes (B) e na microglia ativada (C) por citometria de fluxo. MFI = Intensidade Mediana de Fluorescência. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

4.4.2 Papel das meMSC na infiltração das subpopulações de linfócitos T.

Posteriormente, avaliamos os linfócitos T infiltrantes no SNC, uma vez que são os maiores responsáveis pelos danos existentes na EAE. Assim, observamos a diminuição de linfócitos T CD4⁺ nos animais tratados com as meMSC (Fig. 22A), sendo que também há menor infiltrado de células Th1 e Th17, e um maior número de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 (Fig. 22B; Fig. 22C). Além disso, embora haja um maior número de linfócitos T CD8⁺ (Fig. 23A), a maioria desses clones são produtores de IL-10 e a minoria sendo os secretores de IL-17A e IFN- γ (Fig 23B; Fig 23C). Tais resultados foram confirmados ao observamos uma maior concentração de IL-10 e menor de IL-17A, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante de células mononucleares infiltrantes do SNC específicas para MOG₃₅₋₅₅ quando reestimuladas *in vitro* (Fig. 24).

De acordo com a figura 25, a análise da expressão gênica das células mononucleares extraídas do SNC nos mostrou um aumento da transcrição de IDO e IFN-beta.

Figura 22 - As meMSC são capazes de modular o perfil de linfócitos T CD4⁺ infiltrantes do SNC no modelo de EAE. As células mononucleadas do SNC (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) com EAE tratados ou não com meMSC no pico da doença foram estimulados ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) durante 12 horas e todos os grupos receberam brefeldina 1000 x nas últimas 4 horas. Após a incubação, foi analisada a frequência e o número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (A) e sua produção das citocinas IFN-γ, IL-17A e IL-10 (B) por citometria de fluxo representado pelo grupo estimulado com MOG₃₅₋₅₅, seguido dos gráficos representativos (C). Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05.

Figura 23 - As meMSC são capazes de modular o perfil de linfócitos T CD8⁺ infiltrantes do SNC no modelo de EAE. As células mononucleadas do SNC (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) com EAE tratados ou não com meMSC no pico da doença foram estimulados ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) durante 12 horas e todos os grupos receberam brefeldina 1000 x nas últimas 4 horas. Após a incubação, foi analisada a frequência e o número absoluto de linfócitos T CD8⁺ (A) e sua produção das citocinas IFN-γ, IL-17A e IL-10 (B) por citometria de fluxo representado pelo grupo estimulado com MOG₃₅₋₅₅, seguido dos gráficos representativos (C). Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05; *** p < 0,001.

Figura 24 - Análise do perfil de citocinas de células mononucleares do SNC de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a resposta efetora da doença. As células mononucleadas do SNC (1×10^6 células/poço) de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) com EAE tratados ou não com meMSC no pico da doença foram estimulados ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL). Após 96 horas o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001

Figura 25 - Expressão gênica da medula espinal de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a fase efetora da doença. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) foram imunizados com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅

de acordo com os materiais e métodos e no mesmo dia tratados com tratados com 1×10^6 meMSC/animal. No pico da doença a porção distal da medula espinal foi retirada e o mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica. Os dados foram normalizados com o gene da β -actina e comparados com o grupo Controle. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística T test.

4.5 Avaliação das células recirculantes no baço perante o tratamento com meMSC.

Podemos verificar no baço, durante a fase efetora da EAE que, com o pico dos sinais clínico, a permanência da diminuição das citocinas IFN- γ , IL-17A, TNF- α , além do aumento da secreção de IL-10 nos animais tratados com meMSCs (Fig. 26).

Figura 26 - Análise do perfil de citocinas do baço de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a fase efetora da doença. O baço de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) com EAE tratados ou não com meMSC durante o pico da doença foram processados e 1×10^6 de células/poço foram estimulados ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 μ g/mL). Após 96 horas o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Dados representativos de dois experimentos independentes. T test * p < 0,05.

Tais achados são corroborados pela diminuição da expressão gênica de RorC, o fator de transcrição das células Th17. Curiosamente, vimos uma diminuição de FoxP3, apesar de haver uma tendência ao aumento de IL-10 e da citocina IL-27. Além disso, também observamos um aumento de IDO (Fig. 27).

Figura 27 - Expressão gênica do baço de animais com EAE tratados ou não com meMSC durante a fase efetora da doença. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT (n=10) foram imunizados com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ de acordo com os materiais e métodos e no mesmo dia tratados com tratados com 1×10^6 meMSC/animal. Durante o pico da doença, o mRNA do baço foi extraído para posterior análise de expressão gênica. Os dados foram normalizados com o gene da β -actina e comparados com o grupo controle. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística T test * p < 0,05; ** p < 0,01.

4.6 Análise da capacidade das meMSC modularem a produção de citocinas *in vitro*.

Em geral nossos resultados nos mostraram que as meMSC são capazes de modular diretamente a secreção de citocinas por linfócitos T em animais com EAE. Deste modo decidimos confirmar essa capacidade a partir do co-cultivo *in vitro* de linfócitos T CD4⁺ MOG-específicas e meMSC estimuladas ou não. O que pudemos observar é que a estimulação com α -CD3/ α -CD28 na ausência de meMSC aumentou a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-2, pelos linfócito T, o que é significativamente revertido na presença das meMSC em todas as condições, inclusive estimuladas com MOG₃₅₋₅₅ (Fig. 28).

Figura 28 - Análise da produção de citocinas dos linfócitos T CD4⁺ em co-cultura com as meMSC. Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados do baço de animais 2D2 KI por *cell sorting*. Em seguida, foram cultivados na presença ou ausência de meMSC (proporção 1 meMSC para 10 linfócitos). As células foram estimuladas ou não com α -CD3/ α -CD28 (2 μ g/mL) ou MOG₃₅₋₅₅ (50 μ g/mL). Todas as condições foram realizadas em triplicata. Após 5 dias o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. T test ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

5 DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais têm sido exploradas nos últimos anos, ampliando sua aplicabilidade na medicina regenerativa, como por exemplo, no tratamento de doenças autoimunes. Atualmente há uma gama de estudos que utilizam as MSCs derivadas de diversos tecidos como ferramenta para compreender e desenvolver terapias, e embora o potencial imunossupressor das MSC já tenha sido descrito, neste trabalho demonstramos a capacidade reguladora das meMSCs no tratamento da EAE.

Essas células podem ser encontradas no útero e tubas uterinas, que têm a mesma origem embrionária e são anatomicamente divididos em perimétrio, miométrio e endométrio. Na camada basal do endométrio podemos encontrar as MSCs, visto que é o local de regeneração tecidual responsável por reconstruir a camada funcional perdida após a finalização do ciclo estral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Em camundongos, a fase estro é equivalente com a fase proliferativa dos humanos, devido ao desenvolvimento do endométrio chegar ao seu ápice nas duas espécies, tornando a camada funcional mais espessa (BYERS et al., 2012). Sugerimos que essa regeneração durante a fase proestro possa ser a responsável pelo maior rendimento de meMSC obtidas nesse estágio. Como ao terminar o ciclo estral, o tecido conjuntivo da camada funcional precisa ser regenerado, há uma intensa proliferação celular e, portanto, um aumento no número de MSCs e em seu rendimento ao extrairmo-las.

Ao utilizarmos as meMSC como tratamento da EAE, demonstramos que foram capazes de induzir efeitos benéficos no curso da doença, através da avaliação do escore clínico dos animais. Foi possível demonstrar que ao decorrer da formação da resposta imune adaptativa nos órgãos linfoides secundários, as meMSC agem diretamente sobre os linfócitos T CD4⁺, haja vista que levaram a uma menor polarização de linfócitos T CD4⁺ para Th1 e Th17, com diminuição da secreção de IL-17A e IFN- γ . Concomitantemente, houve uma expansão de células Tr1, evidenciado pelo aumento na produção de citocinas supressoras, como IL-10 e IL-27. Todavia, apesar deste aumento, não observamos redução na ativação de células dendríticas e macrófagos, demonstrado pela constância da expressão de moléculas de ativação.

Apesar do efeito direto em linfócitos T CD4⁺, podemos pensar que a presença das meMSC induz a produção de IL-27 por células dendríticas gerando as células Tr1. Já foi demonstrando que a sinalização IL-27 induzida pela molécula CD39 em células dendríticas limita a geração de células efectoras Th1 e Th17 no modelo de EAE (MASCANFRONI et al., 2013). A IL-10 é uma importante citocina imunossupressora produzida por células da imunidade inata e adaptativa que age regulando negativamente células Th1. No entanto, a fonte de IL-10 a partir de células T permaneceu desconhecida até à descrição de células Tr1 produtoras de IL-10. Além disso, essas células podem suprimir a proliferação de células T de maneira depende da citocina IL-27 (AWASTHI et al., 2007) e independente de FoxP3 (BARRAT et al., 2002; VIEIRA et al., 2004). Nossos resultados mostram que as meMSC são capazes de modular diretamente a diferenciação de linfócitos T nos linfonodos drenantes, sem agir sobre as células apresentadoras de antígenos, gerando a subpopulação Tr1, responsável por secretar grandes quantidades IL-10, uma citocina anti-inflamatória importante para a melhora dos sinais clínicos da EAE.

Sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ orquestram o processo inflamatório e os linfócitos T CD8⁺ provocam a morte direta de neurônios ao chegarem ao SNC. Para isso, precisam ser ativados e polarizados via apresentação de antígenos de mielina realizada por APCs residentes, que expressam moléculas de MHC I e moléculas coestimulatórias como CD80 e CD86. Em macrófagos, as MSCs são capazes de diminuir a capacidade fagocítica, aumentar a produção de IL-10 e TGF-β, diminuir a expressão de moléculas de ativação CD80 e CD86 e consequentemente inibir a proliferação de linfócitos T CD8⁺ e induzir a expansão de Tregs (CHIOSSONE et al., 2016). Em células dendríticas, já foi demonstrado que as MSCs são capazes de induzir a expressão de PD-L1, uma molécula supressora que, ao interagir com seu receptor PD-1, reduz a proliferação de linfócitos (MORAVEJ et al., 2016). Ademais, as células dendríticas quando em repouso, apresentam baixos níveis de CD80, CD86 e MHC II (KARNI et al., 2006; MENGES et al., 2002).

Ao atentarmos ao SNC, observamos um menor infiltrado inflamatório de T CD4⁺ e macrófagos com maior secreção de IL-10 e menor de IFN-γ e IL-17A, associado ao fato de que as células da microglia apresentavam um perfil menos ativado. Portanto, os clones de

linfócitos T autorreativos que alcançavam o SNC encontravam dificuldade para se reativar, demonstrando um papel neuroprotetor das meMSC no modelo de EAE.

Os efeitos imunomodulatórios e neuroprotetores das MSCs já foram descritos por outros grupos, sendo o tratamento realizado com células-tronco provenientes do tecido adiposo (YOUSEFI et al., 2016), da medula óssea (KASSIS et al., 2008) e do endométrio humano (PERON et al., 2012). Nossos dados complementam essa lista, uma vez que demonstraram que as células-tronco derivadas do endométrio murino também são capazes de atenuar o desenvolvimento da EAE. Desta forma, demonstrou-se através da utilização de MSCs-GFP sua migração ao SNC durante a EAE (GERDONI et al., 2007), mais especificamente no cerebelo e no tronco encefálico (GORDON et al., 2008). Devemos ressaltar que todos utilizaram dose única de MSC ao 10º dia após imunização por via intraperitoneal. De acordo com nossos resultados, uma única dose no início da formação da resposta imune não é o suficiente para melhorar o escore clínico dos animais (dados não apresentados), porém a dose reforço ao 10º dia atrasa significativamente o desenvolvimento da EAE. Em conjunto, esses dados sugerem a necessidade da presença das MSCs no SNC impedindo que clones autorreativos o alcancem e provoquem danos, porém os mecanismos envolvidos ainda precisam ser elucidados.

Corroborando isso, os resultados aqui descritos demonstram uma modulação nas populações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Essa capacidade das MSC também já foi relatada em estudos *in vitro* e em modelos *in vivo*. Durante a diferenciação *in vitro* de células Th0 para Th1 na presença das MSCs, ocorre uma diminuição da produção de IFN- γ pelos linfócitos diferenciados, entretanto quando estão presentes na diferenciação de Th2, estimulam a produção de IL-4 por esses linfócitos. Além disso, na co-cultura de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) com MSC, observa-se um aumento da população de células Tregs $CD25^+FoxP3^+$ secretoras de IL-10 (AGGARWAL; PITTERNGER, 2016), corroborando nossos achados. As células T $CD4^+$ *naïves* diferenciadas *in vitro* através da estimulação com α -CD3, α -CD28, rIL-1 β , rIL-6, rIL-23 e rTGF- β , condições de diferenciação para a população Th17, na presença das MSC notou-se a produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 e a diminuição da produção de IL-17, IL-22, IFN- γ e TNF- α . Inclusive, observou-se uma

diminuição na expressão de RorC e aumento de FoxP3 e ainda foi possível constatar que a expressão de CCR6 encontrava-se mais baixa nessas células (GHANNAM et al., 2010). A diminuição desse receptor é muito importante se a contextualizarmos no modelo *in vivo*, haja vista que células da BLCR secretam seu ligante, a quimiocina CCL20, sendo um importante fator quimioatraente para o SNC (REBOLDI et al., 2009). Portanto, se os linfócitos autorreativos apresentarem uma redução na expressão desse receptor, haverá mais dificuldade de entrada no SNC. Já as interações entre os linfócitos T citotóxicos e as MSC são escassas na literatura, mas há demonstração de que as MSCs podem diminuir a secreção de IFN- γ e TNF- α por células T CD8⁺ (RASMUSSEN et al., 2007).

Nossos achados também são corroborados *in vivo*. Um grupo demonstrou que MSCs derivadas da medula óssea são capazes de diminuir proliferação e ativação de linfócitos Th1 e Th17, e aumentar as Tregs (LUZ-CRAWFORD et al., 2013). Esplenócitos totais de animais C57BL/6 WT foram estimulados com o ativador policlonal de linfócitos PHA (*Phytohemagglutinin*) na presença ou ausência de MSCs do tecido adiposo e verificou-se uma diminuição de IFN- γ , IL-17A e T-bet (RAFEI et al., 2009; RASMUSSEN et al., 2007). Destarte, as MSCs derivadas de diferentes tecidos humanos e murinos, são propensas a inibir linfócitos Th1 e Th17 e estimular as Tregs tanto em abordagens *in vivo* e *in vitro*.

As células da microglia são consideradas os macrófagos residentes do SNC e seu papel ao longo do desenvolvimento da EAE está envolvido na interação com linfócitos T autorreativos infiltrantes. Essas células, assim como os macrófagos circulantes, dependendo dos estímulos envolvidos podem levar a um fenótipo protetor ou lesivo. Quando estão em estado quiescente, apresentam baixa expressão de CD80, CD86, CD40, CD45, e MHC II, porém na presença de estímulos inflamatórios, essa expressão encontra-se elevada favorecendo a apresentação de antígenos e reativação de linfócitos T no órgão alvo (CZECH; GRESSENS; KAINDL, 2011). Em modelo experimental da Doença de Parkinson, as MSC foram capazes de induzir a diferenciação de células da microglia para o fenótipo M2, que possui características anti-inflamatórias. Estes macrófagos foram responsáveis por diminuir a quantidade da fosfoproteína pré-sináptica α -sinucleína que, conseqüentemente, levou ao aumento da viabilidade neuronal (PARK et al., 2016). As MSCs também são descritas por

induzirem a autofagia e diminuïrem o acúmulo de placa β -amiloide na Doença de Alzheimer (SHIN et al., 2014). O perfil menos ativado da micróglia também foi visto nos animais com EAE tratados com as meMSC.

Diversos mecanismos de ação das MSC foram descritos, e a expressão intracelular de IDO pelas MSCs estimuladas com IFN- γ já é conhecido (KRAMPERA et al., 2006). Sendo assim, também vimos um aumento de IDO e IFN- β na medula espinhal dos animais tratados, tornando-se grandes candidatos responsáveis pela imunossupressão desencadeada pelas meMSC. A expressão da IDO no SNC de animais com EAE já foi demonstrado, mas a sua repercussão biológica ainda não foi esclarecida (KWIDZINSKI et al., 2005). Há descrições de que as APCs humanas expressam IDO e inibem a proliferação de linfócitos T, como as células dendríticas caracterizadas por CD123⁺ e CCR6⁺ (MUNN et al., 2002). A IDO também é expressa por macrófagos que inibem a proliferação de T CD4⁺, T CD8⁺, células NK e linfócitos B (FRUMENTO et al., 2002).

Por sua vez, o IFN- β é uma droga supressora utilizada como primeira linha de tratamento de pacientes com esclerose múltipla, desde 1993. Vantagens e desvantagens são encontradas na terapia com IFN- β , pois exigem um tratamento crônico, com eficácia limitada e perda dos efeitos benéficos com a descontinuação do tratamento, mas, por outro lado melhoram os sinais clínicos e o conforto do paciente (MCGRAW et al., 2013; PALMERAND; ALAVIJEH, 2012). Entre seus mecanismos de ação, a literatura demonstra que esse interferon do tipo I é capaz de induzir *in vitro* células FoxP3⁺ (RAMAN; STEINMAN, 2013) e realiza o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 na geração de Th1, e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (INOUE et al., 2012). Tais achados corroboram os nossos, uma vez que é possível especularmos que o tratamento com as MSCs aumente síntese de IFN- β que, por sua vez, auxilia na expansão das Tregs secretoras de IL-10, como observamos.

Portanto, observamos que as meMSC são capazes de diminuir o infiltrado inflamatório composto por macrófagos e linfócitos T, além de modular os subtipos de linfócitos e a ativação de células residentes, como a microglia. Além disso, as moléculas IDO e IFN- γ parecem estar envolvidas nos mecanismos pelo qual as meMSC fazem isso.

Recentemente, demonstrou-se que as MSC secretam microvesículas ricas proteínas e lipídeos, bem como em mRNA, miRNA, RNA não codificante, tRNA, Rrna, mas raramente DNA. Esses exossomas após serem liberados, serão incorporados por células do organismo, havendo uma assimilação destes (HANNAFON; DING, 2013; YOON; KIM; GHO, 2014). A liberação dessas microvesículas por MSC contendo miRNA têm sido utilizadas como estudos para geração de medidas terapêuticas para várias doenças, incluindo câncer (BLISS et al., 2016), osteoporose (YOU et al., 2016) e esclerose múltipla. Diversos trabalhos vêm mostrando a participação de miRNA transferidos através de microvesículas como tratamento da EAE, inclusive, durante o tratamento com IFN- β (HECKER et al., 2013; YANG; PAN; QIAN, 2016). Todavia, se há um papel para os exossomas secretados pelas MSCs em nosso modelo, ainda precisa ser esclarecido.

Em suma, nossos resultados apontam as meMSC como um potente supressor, haja vista que atrasam a formação da resposta imune adaptativa comprometendo o desenvolvimento da EAE. Isso envolve a menor polarização de linfócitos T CD4⁺ para Th1 e Th17 e geração de células Tr1 secretoras de IL-10 e induzidas pela IL-27, que tentam reduzir processo inflamatório e suas ações deletérias. Consequentemente, há uma diminuição de células infiltrantes no SNC, incluindo linfócitos T CD4⁺ e macrófagos com maior secreção de IL-10 e menor de IFN- γ e IL-17A, e células residentes como a microglia apresentavam um perfil menos ativado e com a participação da IDO e do IFN- β , portanto, os clones de linfócitos T autorreativos que alcançavam o SNC encontravam dificuldade para se reativar, demonstrando um papel neuroprotetor das meMSC no modelo de EAE. Portanto, neste trabalho descrevemos alguns mecanismos das meMSC já conhecidos e esperamos adicionar ao conhecimento de suas características imunomoduladoras, auxiliando no desenvolvimento de futuras medidas terapêuticas.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento com as meMSC é capaz de atrasar o aparecimento dos sinais clínicos da EAE;
- As meMSC não alteram o fenótipo ativador de células apresentadoras de antígenos.
- As meMSC são capazes de diminuir a polarização de linfócitos T CD4⁺ para Th1 e Th17 e levar a geração de células Tr1 secretoras de IL-10 induzidas pela IL-27;
- As meMSCs levam ao menor infiltrado inflamatório no SNC, incluindo linfócitos T CD4⁺ e macrófagos com maior secreção de IL-10 e menor de IFN- γ e IL-17A;
- Células residentes como a microglia apresentavam um perfil menos ativado e com a participação da IDO e do IFN- β em animais tratados com as meMSCs.

REFERÊNCIAS*₁

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- ARCHELOS, J.J.; STORCH, M.K.; HARTUNG, H.P. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 47, p. 694-706, 2000.
- AULETTA, J.J.; BARTHOLOMEW, A.M.; MAZIARZ, R.T.; DEANS, R.J.; MILLER, R.H.; LAZARUS, H.M.; COHEN, J.A. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. **Immunotherapy**, v. 4, n. 5, p. 529-547, 2012.
- AWASTHI, A.; CARRIER, Y.; PERON, J.S.P.; BETTELLI, E.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; KUCHROO, V.K.; OUKKA, M.; WEINER, H.L. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 1380-1389, 2007.
- BAILEY, S.L.; MACMAHON, E.J. CNS Myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides preferentially polarize CD4⁺ Th17 cells in relapsing EAE. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 172-180, 2007.
- BARRAT, F.J.; CUA, D.J.; BOONSTRA, A.; RICHARDS, D.F.; CRAIN, C.; SAVELKOUL, H.F.; DE-WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; HAWRYLOWICZ, C.M.; O'GARRA, A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. **J. Exp. Med.**, v. 195, p. 603-616, 2002.
- BI, Y.; EHIRCHIOU, D.; KILTS, T.M.; INSKON, C.A.; EMBREE, M.C.; SONOYAMA, W.; LI, L.; LEET, A.L.; SEO, B.M.; ZHANG, L.; SHI, S.; YOUNG, M.F. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nat. Med.**, v. 13, n. 10, p. 1219-1227, 2007.
- BLISS, S.A.; SINHA, G.; SANDIFORD, O.A.; WILLIAMS, L.M.; ENGELBERTH, D.J.; GUIRO, K.; ISENALUMHE, L.L.; GRECO, S.J.; AYER, S.; BRYAN, M.; KUMAR, R.; PONZIO, N.M. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. **Cancer Res.**, v. 76, n. 19, p. 5832-5844, 2016.

¹ *De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BYERS, S.L.; WILES, M.D.; DUNN, S.L.; TAFT, R.A. Mouse Estrous Cycle Identification Toll and Images. **PlosOne**, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2012.

CHANG, C.J.; YEN, M.; CHEN, Y.C.; CHIEN, C.C.; HUANG, H.I.; BAI, C.H.; YEN, B.L. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon- γ . **Stem Cells**, v. 24, p. 2466-2477, 2006.

CHIOSSONE, L.; CONTE, R.; SPAGGIARI, G.M.; SERRA, M.; ROMEI, C.; BELLORA, F.; BECCHETTI, F.; ANDALORO, A.; MORETTA, L.; BOTTINO, C. Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. **Stem Cells**, v. 34, p. 1909–1921, 2016.

CHUNG, Y.; CHANG, S.H.; MARTINEZ, G.J.; YANG, X.O.; NURIEVA, R.; KANG, H.S.; MA, L.; WATOWICH, S.S.; JATTEN, A.M.; TIAN, Q.; DONG, C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576-587, 2009.

CZECH, M.; GRESSENS, P.; KAINDL, A.M. The yin and yang of microglia. **Dev. Neurosci.**, v. 33, p. 199-209, 2011.

DAS-SARMA, J.; CIRIC, B.; MAREK, R.; SADHUKHAN, S.; CARUSO, M.L.; SHAFAGH, J.; FITZGERALD, D.C.; SHINDLER, K.S.; ROSTAMI, A. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neuroinflammation**, v. 6, p. 14, 2009.

DI-NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-3843, 2002.

DOMINICI, M. MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cell Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ENGLISH, K.; RYAN, J.; TOBIN, L.; MURPHY, M.; BARRY, F.; MAHON, B. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺ CD25^{high} forkhead box P3⁺ regulatory T cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 156, n. 1, p. 149-160, 2009.

FALLARINO, F.; YOU, S.; MAEGRATH, B.C.; CAVENER, D.R.; VACCA, C.; ORABONNA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M.L.; VOLPI, C.; SANTAMARIA, P.; FIORETTI, I. M. C.; PUCCHETTI, P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naïve T cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 6752-6761, 2006.

FERRARA, P.V. The unbiased Search of Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 17, n. 5, p. 471-479, 2016.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; LATSINIK, N.V.; PANASYUK, A.F.; KEILLISS-BOROK. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Bloning in vitro and retransplantation *in vivo*. **Transplantation**, v. 17, p. 331-340, 1974.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G.B. Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 4, p. 459-468, 2002.

GERDONI, E.; GALLO, B.; CASAZZA, S.; MUSIO, S.; BONANI, I.; PEDEMONTE, E.; MANTEGAZZA, R.; FRASSONI, F.; MANCARDI, G.; PEDOTTI, R.; UCCELI, A. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic imune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Ann. Neurol.**, v. 61, p. 219-227, 2007.

GHANNAM, S.; PENE, J.; TORCY-MOQUET, G.; JORGENSEN, C.; YSSEL, H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. **J. Immunol.**, v. 185, n. 1, p. 302-312, 2010.

GHARIBI, T.; AHMADI, M.; SEYFIZADEH, N.; JADIDI-NIARAGH, F.; YOUSEFI, M. Immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of Multiple Sclerosis. **Cellular Immunology**, v. 293, p. 113-121, 2015.

GIESEKE, F.; SCHUTT, B.; VIEBAHN, S.; KOSCIELNIAK, E.; FRIEDRICH, W.; HANDGRETINGER, R.; MULLER, I. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN γ R1 signaling and IDO expression. **Blood**, v. 100, n. 6, p. 2197-2200, 2007.

GLENNIE, S.; SOEIRO, I.; DYSON, P.J.; LAM, E.W-F.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2821-2827, 2005.

GONZALES, M.A.; GONZALES-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.**, v. 60, p. 1006-1019, 2009.

GONZALES-REY, E.; ANDERSON, P.; GONZALEZ, M.A.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. **Gut**, v. 58, p. 929-939, 2009.

GORDON, D.; PAVLOVSKA, G.; GLOVER, C.; UNEY, J.B.; WRAITH, D.; SCOLDING, N.J. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. **Neuroscience Letters**, v. 488, p. 71-73, 2008.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 393-407, 2009.

GOVERMAN, J.; PERCHELLET, A.; HUSEBY, E.S. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, n. 2, p. 239-245, 2005.

GREVE, B.; MAGNUSSON, C.G.; MELMS, A.; WEISSERT, R. Immunoglobulin isotypes reveal a predominant role of type 1 immunity in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 121, p. 120-125, 2001.

GRZESIUK, A.K. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá – Mato Grosso. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 65, n. 3, p. 635-638, 2006.

HANAMSAGAR, R.; BILBO, S.D. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 160, p. 127-133, 2016.

HANNAFON, B.N.; DING, W.Q. Intercellular communication by exosome-derived micrnas in cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 7, p. 14240–14269, 2013.

HECKER, M.; THAMILARASAN, M.; KOCZAN, D.; SCHRÖDER, I.; FLECHTNER, K.; FREIESLEBEN, S.; FÜLLEN, G.; THIESEN, H.J.; ZETTL, U.K. MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 5, n. 8, p. 16087-16110, 2013.

HEMMER, B; ARCHELOS, J.J.; HARTUNG, H.P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 291-301, 2002.

INOUE, M.; WILLIAMS, K.L.; OLIVER, T.; VANDENABEELE, P.; RAJAN, J.V.; MIAO, E.A.; SHINOHARA, M.L. Interferon- β therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. **Sci. Signal.**, v. 5, p. 38, 2012.

IVANOV, I.I.; MCKENZIE, B.S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C.E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J.J.; CUA, D.J.; LITTMAN, D.R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JAZEDJE, T.; PERIN, P.; CZERESNIA, C.E.; MALUF, M.; HALPERN, S.; SECCO, M.; BUENO, D.F.; VIEIRA, N.M.; ZUCCONI, E.; ZATS, M. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 46, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica, Texto Atlas. Aparelho Reprodutor Feminino. **Guanabara e Koogan**, v. 10, p. 433, 2004.

KANG, Z.; ALTUNTAS, C.Z.; GULEN, M.F.; LIU, C.; GILTIAY, N.; QIN, H.; LIU, L.; QIAN, W.; RANSOHOFF, R.M.; BERGMANN, C.; STOHLMAN, S.; TUOHY, V.K.; LI, X. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 414-425, 2010.

KARNI, A.; ABRAHAM, M.; MONSONEGRO, A.; CI, G.; FREEMAN, G.J.; HAFNER, D.; KHOURY, S.J.; WEINER, H.L. Innate Immunity in Multiple Sclerosis: Myeloid Dendritic Cells in Secondary Progressive Multiple Sclerosis are activated and give a proinflammatory immune response. **J. Immunol.**, v. 177, p. 4196-4202, 2006.

KASSIS, I.; GRIGORIADIS, N.; GOWDA-KURKALLI, B.; MIZRACHI-KOL, R.; BEN-HUR, T.; SLAVIN, S.; ABRAMSKY, O.; KARUSSIS, D. Neuroprotection and Immunomodulation With Mesenchymal Stem Cells in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Arch. Neurol.**, v. 65, n. 6, p. 753-761, 2008.

KIM, J.M.; LEE, S.T.; CHU, K.; JUNG, H.; SONG, E.C.; KIM, S.J.; SINN, D.I.; KIM, J.H.; PARK, D.K.; KANG, K.M.; HYUNG, H.N.; PARK, H.K.; WON, C.H.; KIM, K.H.; KIM, M.; KUN, L.S.; ROH, J.K. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhage stroke model. **Brain Res.**, v. 1183, p. 43-50, 2007.

KOMIYAMA, Y.; NAKAE, S.; MATSUKI, T.; NAMBU, A.; ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 177, n. 1, p. 566-573, 2006.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KRAMPERA, M.; COSMI, L.; ANGELLI, R.; PASINI, A.; LIOTTA, F.; ANDREINI, A.; SANTARLASCI, V.; MAZZINGHI, B.; PIZZOLO, G.; VINANTE, F.; ROMAGNANI, P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Role for Interferon in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Stem cells**, v. 24, p. 386-439, 2006.

KREMENCHUTZKY, M.; COTTRELL, D.; RICE, G.; HADER, W.; BASKERVILLE, J.; KOOPMAN, W.; EBERS, G.C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7 – progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evolution. **Brain**, v. 122, p. 1941-1949, 1999.

KWIDZINSKI, E.; AKTAS, O.; RICHTER, D.; MUTLU, L.; ZIPP, F.; NITSCH, R.; BECHMANN, I. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. **FASEB J.**, v. 19, p. 1347-1349, 2005.

LE-BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 383-396, 2012.

LEE, H.J.; KO, J.H.; JEONG, H.J.; KO, A.Y.; KIM, M.K.; WEE, W.R.; YOON, S-O.; OH, J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells protect against autoimmunity via CCL2-dependent recruitment of myeloid-derived suppressor cells. **The Journal of Immunology**, v. 94, n. 8, p. 3634-3645, 2015.

LOSY, J.; MEHTA, P.D.; WISNIEWSKI, H.M. Identification of IgG subclasses oligoclonal bands in multiple sclerosis CSF. **Acta. Neurol. Scand.**, v. 82, p. 4-8, 1990.

LUZ-CRAWFORD, P.; KURTE, M.; BRAVO-ALEGRI, J.; CONTRERAS, R.; NOVA-LAMPERTI, E.; TEJEDOR, G.; NOEL, D.; JORGENSEN, C.; FIGUEROA, F.; DJOUAD, F. Mesenchymal stem cells generate CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. **Stem Cells Research and Therapy**, v. 4, p. 65, 2013.

MASCANFRONI, I.D.; YESTE, A.; VIEIRA, SM.; BURNS, E.J.; PATEL, B.; SLOMA, I.; WU, Y.; MAYO, L.; BEN-HAMO, R.; EFRONI, S.; KUCHROO, V.K.; ROBSON, S.C.; QUINTANA, F.J. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. **Nat. Immunol.**, v. 14, n. 10, p. 1054-1063, 2013.

MCGRAW, C.A.; LUBLIN, F.D. Interferon beta and glatiramer acetate therapy. **Neurotherapeutics**, v. 10, p. 2–18, 2013.

MENGES, M.; RORNER, S.; VOIGTLANDER, C.; SCHINDLER, H.; KUKUTSCH, N.A.; BOGDAN, C.; ERB, K.; SCHULER, G.; LUTZ, M.B. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 1, p. 15-22, 2002.

MILLER, D.H.; LEARY, S.M. Primary-progressive multiple sclerosis. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 10, p. 903-912, 2007.

MORAVEJ, A.; KARIMI, M.H.; GERAMIZADEH, B.; AZARPIRA, N.; ZARNANI, A.H.; YAGHOBI, R.; KHOSRAVI, M.; KALANI, M.; GHARESI-FARD, B. Mesenchymal Stem Cells Upregulate the Expression of PD-L1 But Not VDR in Dendritic Cells. **Immunol. Invest.**, v. 13, p. 1-17, 2016.

MOREIRA, M.A.; FELIPE, E.; MENDES, M.F.; TILBERY, C.P. Esclerose Múltipla: Estudo descritivo de suas formas clínicas em 302 casos. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 58, n. 2-B, p. 460-466, 2000.

MUNN, D.H.; SHARMA, M.D.; LEE, J.R.; JHAVER, K.G.; KESKIN, D.B.; MARSHALL, B.; CHANDLER, P.; ANTONIA, S.J.; BURGESS, R.; SLINGLUFF, C.L.-JR.; MELLOR, A.L. Potencial regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v.13, n. 5588, p. 1867-1870, 2002.

NOSEWORTHY, J.H.; LUCCHINETTI, C.; RODRIGUEZ, M.; WEINSHENKER, B.G. Multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 938-951, 2000.

OKSENBERG, J.; HAUSER, S.L. Genetics of multiple sclerosis. **Neurol. Clin.**, v. 1, p. 61-75, 2005.

PALMER, A.M. Multiple Sclerosis and the Blood-Central Nervous System Barrier. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 1, p. 10, 2013.

PALMER, A.M. Terifluminode, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 11, n. 11, p. 1313-1323, 2010.

PALMERAND, A.M.; ALAVIJEH, S.A. Translational CNS medicines research. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19, p. 1068-1078, 2012.

PARK, H.J.; OH, S.H.; KIM, H.N.; JUNG, Y.J.; LEE, P.H. Mesenchymal stem cells enhance α -synuclein clearance via M2 microglia polarization in experimental and human parkinsonian disorder. **Acta. Neuropathol.**, v. 132, n. 5, p. 685-701, 2016.

PELLETIERAND, D.; HAFLER, D.A. Fingolimod for multiple sclerosis. **New England Journal Medicine**, v. 366, n. 4, p. 339-347, 2012.

PERON, J.P.; YANG, K.; CHEN, M.L.; BRANDAO, W.N.; BASSO, A.S.; COMMODARP, A.G.; WEINER, H.L.; RIZZO, L.V. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. **J. Neuroimmunol.**, v. 227, n. 1-2, p. 10-17, 2010.

PERON, J.P.S.; JAZEDJE, T.; BRANDÃO, W.N.; PERIN, P.M.; MALUF, M.; EVANGELISTA, L.P.; HALPERN, S.; NISENBAUM, M.G.; CZERESNIA, C.E.; ZATZ, M.; CÂMARA, N.O.S.; RIZZO, L.V. Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. **Stem Cell Rev. and Rep.**, v. 8, p. 940-952, 2012.

POGGI, A.; PREVOSTO, C.; MASSARO, A-M.; NEGRINI, S.; URBANI, S.; PIERRI, I.; SCCARDI, R.; GOBBI, M.; ZOCCHI, M.R. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. **J. Immunol.**, v. 175, n. 10, p. 6352-6360, 2005.

PONOMAREV, E.; SHIVER, L.P.; MARESZ, K.; DITTEL, B.N. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. **J. Neurosc. Res.**, v. 81, p. 374-389, 2005.

RAFEI, M.; BIRMAN, E.; FORNER, K.; GALIPEAU, J. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1799-1803, 2009.

RAMAN, C.; STEINMAN, L. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 44, p. 144-120, 2013.

RANSOHOFF, R.M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 569-581, 2003.

RASMUSSEN, I.; UHLIN, M.; LE-BLANC, K.; LEVITSKY, V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 4, p. 887-893, 2007.

REBOLDI, A.; COISNE, C.; BAUMJOHANN, D.; BENVENUTO, F.; BOTTINELLI, D.; LIRA, S.; UCCELLI, A.; LANZAVECCHIA, A.; ENGELHARDT, B.; SALLUSTO, F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of Th17 cell into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nature Immunol.**, v. 10, p. 514-523, 2009.

RIVERS, T.M.; SPRUNT, D.H.; GERRY, B.P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkey. **J. Exp. Med.**, v. 58, p. 39-53, 1933.

ROTHHAMMER, V.; HEINK, S.; PETERMANN, F.; SRIVASTAVA, R.; CLAUSSEN, M.C.; HEMMER, B.; KORN, T. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of $\alpha 4$ integrin expression during EAE. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 12, p. 2465-2476, 2011.

SHIN, J.Y.; PARK, H.J.; KIM, H.N.; OH, S.H.; BAE, J.S.; HA, H.J.; LEE, P.H. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. **Autophagy**, v. 10, n. 1, p. 32-44, 2014.

Site Oficial da Organização Mundial de Saúde. <http://www.who.int/en/>. Acessado 12 de Novembro de 2016.

SPAGGIARI, C.M.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MORETTA, L. MSC inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6576-6583, 2009.

STAKOVIC, N.D.; TEODOREZYK, M.; PLOEN, R.; ZIPP, F.; SCHMIDT, M.H.H. Microglia-blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. **Aeta Neuropatologia**, v. 131, p. 347-363, 2016.

TOMA, J.G.; MCKENZIE, I.A.; BAGLI, D.; MILLER, F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. **Stem cells**, v. 23, p. 727-737, 2005.

TUBRIDY, N.; BEHAN, P.O.; CAPILDEO, R.; CHAUDHURI, A.; FORBES, R.; HAWKINS, C.P.; HUGHES, R.A.; PALACE, J.; SHARRACK, B.; SWINGLER, R.; YOUNG, C.; MOSELEY, I.F.; MACMANUS, D.G.; DONOGHUE, S.; MILLER, D.H. The effect of anti- $\alpha 4$ integrin antibody on brain lesion activity in MS. **Neurology**, v. 53, n. 3, p. 466-472, 1999.

VARATHARAY, A.; GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**, v.60, p. 1-12, 2016.

VIEIRA, P.L.; CHRISTENSEN, J.R.; MINAEE, S.; O'NEILL, E.J.; BARRAT, F.J.; BOONSTRA, A.; BARTHLOTT, T.; STOCKINGER, B.; WRAITH, D.C.; O'GARRA, A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5986–5993, 2004.

WEKERLE, H.; KOJIMA, K.; LANNES-VIEIRA, J.; LASSMANN, H.; LININGTON, C. Animal models. **Ann. Neurol.**, v. 36, p. 47-53, 1994.

YANG, Q.; PAN, W.; QIAN, L. Identification of the miRNA-mRNA regulatory network in multiple sclerosis. **Neurol. Res.**, v. 4, p. 1-10, 2016.

YEDNOCK, T.A.; CANNON, C.; FRITZ, L.C.; SANCHEZ-MADRID, F.; STEINMANN, L.; KARIN, N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 63-66, 1992.

YOON, Y.J.; KIM, O.Y.; GHO, Y.S. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB Rep**, v. 47, n. 10, p. 531–539, 2014.

YOU, L.; PAN, L.; CHEN, L.; GU, W.; CHEN, J. MiR-27a is Essential for the Shift from Osteogenic Differentiation to Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Postmenopausal Osteoporosis. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 39, n. 1, p. 253-265, 2016.

YOUNG, K-S.; BUCKWALTER, M.; SOREQ, H.; VEZZANI, A.; KAUFER, D. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 53, p. 37-44, 2012.

YOUSEFI, F.; EBTEKAR, M.; SOUDI, S.; SOLEIMANI, M.; HASHEMI, S.M. In vivo immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology Letter**, v. 172, p. 94-105, 2016.

ZHANG, Q.; SHI, S.; LIU, Y.; UYANNE, J.; SHI, Y.; SHI, S.; LE, A.D. Mesenchymal stem cells derived from human gingival are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. **J. Immunol.**, v. 183, p. 7787-7798, 2009.

ANEXOS

A - CUGOLA, F.R.; FERNANDES, I.R.; RUSSO, F.B.; FREITAS, B.C.; DIAS, J.L.M.; GUIMARÃES, K.P.; BENAZZATO, C.; ALMEIDA, N.; PIGNATARI, G.C.; ROMERO, S.; **POLONIO, C.M.**; CUNHA, I.; FREITAS, C.L.; BRANDÃO, W.N.; ROSSATO, C.; ANDRADE, D.G.; FARIA, D.P.; GARCEZ, A.T.; BUCHPIGEL, C.A.; BRACONI, C.T.; MENDES, E.; SALL, A.A.; ZANOTTO, P.A.; PERON, J.P.S.; MUOTRI, A.R.; et al.; The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature (London)**, v. 534, p. 267-271, 2016.

B - **POLONIO, C.M.**; FREITAS, C.L.; ZANLUQUI, N.G.; PERON, J.P.S. Zika Virus Congenital Syndrome: Experimental Models and Clinical Aspects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD)**, Submetido em 14 de abril de 2017 – under review.

LETTER

doi:10.1038/nature18296

The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models

Fernanda R. Cugola^{1*}, Isabella R. Fernandes^{1,2*}, Fabiele B. Russo^{1,3*}, Beatriz C. Freitas², João L. M. Dias¹, Katia P. Guimarães¹, Cecília Benazzato¹, Nathalia Almeida¹, Graciela C. Pignatari^{1,3}, Sarah Romero², Carolina M. Polonio⁴, Isabela Cunha⁴, Carla L. Freitas⁴, Wesley N. Brandão⁴, Cristiano Rossato⁴, David G. Andrade⁴, Daniele de P. Faria⁵, Alexandre T. Garcez⁵, Carlos A. Buchpiguel⁵, Carla T. Braconi⁶, Erica Mendes⁶, Amadou A. Sall⁷, Paolo M. de A. Zanotto⁶, Jean Pierre S. Peron⁴, Alysson R. Muotri² & Patricia C. B. Beltrão-Braga^{1,8}

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) and was first described in 1947 in Uganda following blood analyses of sentinel rhesus monkeys¹. Until the twentieth century, the African and Asian lineages of the virus did not cause meaningful infections in humans. However, in 2007, vectored by *Aedes aegypti* mosquitoes, ZIKV caused the first noteworthy epidemic on Yap Island in Micronesia². Patients experienced fever, skin rash, arthralgia and conjunctivitis². From 2013 to 2015, the Asian lineage of the virus caused further massive outbreaks in New Caledonia and French Polynesia. In 2013, ZIKV reached Brazil, later spreading to other countries in South and Central America³. In Brazil, the virus has been linked to congenital malformations, including microcephaly and other severe neurological diseases, such as Guillain-Barré syndrome^{4,5}. Despite clinical evidence, direct experimental evidence showing that the Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) strain causes birth defects remains absent⁶. Here we demonstrate that ZIKV^{BR} infects fetuses, causing intrauterine growth restriction, including signs of microcephaly, in mice. Moreover, the virus infects human cortical progenitor cells *in vitro*, leading to an increase in cell death. We also report that the infection of human brain organoids results in a reduction of proliferative zones and disrupted cortical layers. These results indicate that ZIKV^{BR} crosses the placenta and causes microcephaly by targeting cortical progenitor cells, inducing cell death by apoptosis and autophagy, and impairing neurodevelopment. Our data reinforce the growing body of evidence linking the ZIKV^{BR} outbreak to the alarming number of cases of congenital brain malformations. Our model can be used to determine the efficiency of therapeutic approaches to counteracting the harmful impact of ZIKV^{BR} in human neurodevelopment.

The recent increase in microcephaly cases in Brazil has been associated with the outbreak of Zika virus (ZIKV)⁷, originating from an Asian-lineage strain that can be spread by *Ae. aegypti* mosquitoes⁸. The Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) has been detected in the placenta and amniotic fluid of two women with microcephalic fetuses^{9–11} and in the blood of microcephalic newborns^{10,12}, suggesting that the virus can cross the placental membrane. The virus has also been identified in the brains and retinas of microcephalic fetuses^{11–13}. However, there is no direct evidence of the mechanism by which ZIKV^{BR} might cause brain malformations. A previous study revealed that the African ZIKV (ZIKV^{AF}, strain MR-766) has the ability to infect human skin cells¹⁴. Neurons and astrocytes in the mouse brain could also be infected, inducing hippocampal degeneration and necrosis of pyriform cells

7 days post-infection¹⁵. More recently, ZIKV^{AF} was also shown to infect human pluripotent stem cell (hPSC)-derived neural progenitor cells (NPCs) *in vitro*, which induced apoptotic cell death¹⁶. These studies were performed using the MR-766 ZIKV^{AF} strain isolated in Uganda in 1947, which shares 87–90% sequence similarity with the Polynesian and Brazilian isolates^{3,17}. Nevertheless, because severe congenital malformations were not reported for African isolates, there is a need to study the association of ZIKV with microcephaly and birth defects with isolates from affected localities, such as the ZIKV^{BR} strain. Therefore, there is an urgent need to develop model systems to determine the relationship between infection with the ZIKV^{BR} strain and birth defects.

We used ZIKV^{BR} isolated from a febrile case in the state of Paraíba, in the northeast of Brazil in 2015 (see Methods). To evaluate the causal relationship between ZIKV^{BR} and birth defects, including brain malformation during development, we first used a murine experimental model in which SJL and C57BL/6 pregnant mice were infected with ZIKV^{BR}, evaluating newborns immediately after birth (Extended Data Fig. 1a). Notably, similar to ZIKV^{BR}-infected human newborns^{18,19}, pups born from the SJL ZIKV^{BR}-infected pregnant females displayed clear evidence of whole-body growth delay or intrauterine growth restriction (IUGR)²⁰ compared to pups born from the mock-infected controls (Fig. 1a, b). Using a qPCR assay, we confirmed the presence of ZIKV^{BR} genomic RNA in several tissues of newborn animals, observing significantly more viral RNA in the brain, confirming the neurotropic nature of the virus (Fig. 1c).

Microcephaly is perhaps the most striking of the birth defects reported in ZIKV^{BR}-infected newborns^{4,18,19}. Mouse models often fail to reproduce the severely reduced brain size and pathological alterations found in human patients^{21,22}, probably owing to differences in gestation time and brain development between the two species. Nevertheless, upon close inspection of the ZIKV^{BR}-infected mouse brains, we noticed cortical malformations in the surviving animals, with reduced cell number and cortical layer thickness, signs associated with microcephaly in humans (Fig. 1d–f). At a cellular level, the neurons in the cortex, thalamus and hypothalamus displayed a ‘vacuolar nuclei’ appearance. This morphology was characterized by central emptiness and marginalized chromatin pattern with nuclear debris, suggesting ongoing cellular death (Fig. 1d and Extended Data Fig. 2). In addition, we also noticed apparent ocular abnormalities, reminiscent of that observed in human patients²³ (Fig. 1g). Thus, SJL infected pups presented congenital malformations with similarities to those in ZIKV^{BR}-infected human newborns. While the impact of ZIKV^{BR}

¹University of São Paulo, Department of Surgery, Stem Cell Laboratory, São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil. ²University of California San Diego, School of Medicine, Department of Pediatrics/Rady Children's Hospital San Diego, Department of Cellular & Molecular Medicine, Stem Cell Program, La Jolla, California 92037-0695, USA. ³Tismoo, The Biotech Company, São Paulo, São Paulo 01401-000, Brazil. ⁴University of São Paulo, Department of Immunology, Neuroimmune Interactions Laboratory, São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ⁵University of São Paulo, Department of Radiology and Oncology, USP School of Medicine, São Paulo, São Paulo 05403-010, Brazil. ⁶University of São Paulo, Department of Microbiology, Institute of Microbiology Sciences, Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ⁷Institute Pasteur in Dakar, Dakar 220, Sénégal. ⁸University of São Paulo, School of Arts, Sciences and Humanities, Department of Obstetrics, São Paulo, São Paulo 03828-000, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

Zika Virus Congenital Syndrome: Experimental Models and Clinical Aspects.

Carolina Manganeli Polonio¹, Carla Longo de Freitas¹, Nagela Ghabdan Zanluqui¹, Jean Pierre Schatzmann Peron^{1,*}.

¹ Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 Cidade Universitária São Paulo – SP – Brazil. CEP 05508-000

***Corresponding author**

Abstract

Viral infections have long been the cause of severe diseases of the human civilization, increasing morbidity and mortality rates worldwide, either in rich or poor countries. YFV, H1N1, HIV, DENV, HBV, HCV, are well known threats to human health, being responsible for, according to the WHO, for more than XXX deaths annually, associated to a huge economic and social cost. In this context, a recently introduced flavivirus in South America, named Zika (ZIKV), led the WHO to declare in February 1st 2016 a state of global warning. ZIKV is an arbovirus of the *Flaviviridae* family firstly isolated from sentinels *Rhesus sp.* monkeys from the Ziika forest in Uganda, Africa, in 1947. Lately, the virus has well adapted to the worldwide spread *Aedes Aegypti* mosquito, the vector for DENV, CHIKV, YFV and many other. At first not considered a threat to human health, everything changed when a skyrocketing number of babies born with microcephaly and adults with Guillain-Barré Syndrome were reported, mainly in northeast of Brazil. It is now well established that the virus is responsible for the so called Congenital Zika Syndrome (CZS), whose most dramatic features are microcephaly, arthrogryposis and ocular damage. Thus, in this review, we provide a brief discussion of these main clinical aspects of the CZS, correlating them with some experimental animal models described so far.