FERNANDA VIEIRA PALADINO

**Potencial imunomodulador de células-tronco
mesenquimais humanas de geleia de Wharton
submetidas à senescência replicativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Anna Carla Renata
Krepel Goldberg
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Sardinha

São Paulo

2017

FERNANDA VIEIRA PALADINO

**Potencial imunomodulador de células-tronco
mesenquimais humanas de geleia de Wharton
submetidas à senescência replicativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Immunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Anna Carla Renata
Krepel Goldberg
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Sardinha

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2017

Aos meus pais, que sempre lutaram com muito amor, carinho, esforço e dedicação para que todos os meus sonhos se tornassem realidade. Obrigada pelo incentivo, apoio e torcida na escolha da vida acadêmica! Espero poder sempre orgulhar vocês! Obrigada por serem meus exemplos! Ao meu marido Ricardo, que esteve do meu lado todos esses anos, me apoiando e vibrando com cada conquista alcançada! Se eu cheguei até aqui só tenho a agradecer a vocês, as pessoas mais importantes da minha vida! Amo vocês!

À minha família! Avós, tios e minha afilhada Rafaella, que sempre torceram pelo meu sucesso!

E a Deus, por estar sempre presente na minha vida, me abençoando e guiando meus caminhos!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma fizeram parte dessa etapa tão importante na minha vida.

À minha orientadora Dra. Anna Carla Goldberg, agradeço pela confiança, paciência, incentivo e pelos ensinamentos que levarei por toda minha vida e que com certeza foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Acho que nossa parceria deu muito certo! Obrigada pela oportunidade, foi um prazer ser sua aluna!

Ao meu coorientador Dr. Luiz Sardinha, agradeço pela ajuda, paciência e dedicação na realização e discussão dos experimentos.

À Dra. Carla Piccinato, agradeço a dedicação e ajuda na realização da análise estatística e discussão de resultados durante o doutorado!

Isis Mozetic, Juliana de Moraes Rodrigues e Aline da Silva, que ajudaram na realização dos experimentos e além de tudo tornaram-se minhas amigas e grandes companheiras de trabalho! Foi muito bom trabalhar com vocês!

A todos os amigos do Centro de Pesquisa Experimental do IIEP. Obrigada pela amizade, pela ajuda, pelas conversas e pelos bons conselhos. Os meus dias no laboratório foram muito mais divertidos com a companhia de vocês! Em especial às minhas amigas Renata Silvério e Grazielle Suhett, que são pessoas especiais e foram muito importantes durante esses anos na convivência dentro e fora do laboratório! Agradeço pela amizade, companheirismo e carinho de sempre!

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, agradeço pela disponibilidade da estrutura física para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
agradeço o auxílio financeiro através do projeto de pesquisa 2014/17292-7 e a
CAPES.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Células-tronco mesenquimais	1
1.2. Imunomodulação.....	3
1.2.1 Interação das CTM com células do sistema imune	5
1.2.2. Moléculas envolvidas no potencial imunomodulador das CTM.....	8
1.3. Plasticidade das CTM	14
1.4. Senescência X Terapia Celular	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Delineamento experimental	20
3.2. Aspectos éticos.....	21
3.3. Obtenção das amostras	21
3.3.1. CTM de cordão umbilical	21
3.3.2. CTM de medula óssea	22
3.4. Protocolos de isolamento de GW-CTM testados	23
3.4.1. Protocolo 1	23
3.4.2. Protocolo 1 modificado	23
3.4.3. Protocolo 2 modificado	24
3.4.4. Protocolo 3 (explante)	24
3.5. Isolamento de MO-CTM	25
3.6. Cultivo das GW-CTM e MO-CTM	26
3.7. Diferenciação adipogênica e osteogênica.....	26
3.8. Congelamento e descongelamento de GW-CTM	27
3.9. Caracterização fenotípica de GW-CTM por citometria de fluxo.....	28
3.10. Caracterização da senescência replicativa	29
3.11. Separação do PBMC de câmara de leucorredução	30
3.12. Ensaio funcional de cocultura de GW-CTM e PMBC alogênicas, com contato (one-way MLR)	30
3.13. Ensaio funcional de cocultura de GW-CTM e PMBC alogênicas, com contato (one-way MLR) na presença de tratamento com IFN- γ	32

3.14.	Ensaio de proliferação celular de PBMC	33
3.15.	Extração de RNA e Síntese de cDNA	34
3.16.	PCR em tempo real (qPCR).....	35
3.17.	Extração de proteínas	36
3.18.	Western Blot.....	37
3.19.	Análise da secreção de citocinas.....	38
3.20.	Tratamento com IL-11 recombinante	39
3.21.	Análise estatística.....	40
4.	RESULTADOS	41
4.1.	Definição de protocolo para obtenção de GW-CTM	41
4.2.	Células isoladas de cordão umbilical apresentaram características morfológicas e moleculares típicas de CTM	42
4.2.1.	Morfologia de GW-CTM.....	42
4.2.2.	Caracterização das CTM por citometria de fluxo	44
4.3.	CTM têm capacidade de se diferenciar em adipócito e osteócito.....	46
4.4.	GW-CTM apresentaram capacidade proliferativa diferente entre amostras e protocolos.....	48
4.5.	GW-CTM atingem a senescência em passagens diferentes.....	51
4.6.	Expressão gênica de p53, isoformas de p53 e componentes da via em GW-CTM após indução de senescência replicativa	54
4.7.	A expressão dos genes de moléculas imunomoduladoras é variável nas GW-CTM	56
4.8.	Secreção basal de moléculas imunomoduladoras é variável nas amostras de GW-CTM.....	60
4.9.	Ensaio funcional em cocultura de GW-CTM e PBMC	63
4.9.1.	GW-CTM suprimem a proliferação de LT CD3 ⁺ estimuladas com PHA em graus diferentes.....	63
4.9.2.	As células T apresentam perfis diferentes de resposta de acordo com cada amostra de PBMC.....	66
4.9.3.	A produção de moléculas imunomoduladoras por GW-CTM varia após cultivo com PBMC.....	68
4.9.4.	Secreção de moléculas imunomoduladores por GW-CTM quando cultivadas com PBMC estimulados com PHA	71
4.10.	Ensaio funcional de cocultura de GW-CTM após tratamento com IFN- γ e em passagem precoce e tardia com PBMC	72
4.10.1.	O número de passagens e o tratamento com IFN- γ não afetam a capacidade imunomoduladora, que varia de acordo com cada GW-CTM.....	72
4.10.2.	Efeito das GW-CTM na proliferação de LT CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ após tratamento com IFN- γ em P5 e P10.....	75
4.10.3.	Produção de moléculas imunomoduladoras por GW-CTM tratadas com IFN- γ em P5 e P10 cultivadas com PBMC.....	77

4.10.4. Secreção de moléculas imunomoduladoras por GW-CTM tratadas com IFN- γ em P5 e P10 cultivadas com PBMC.....	84
5. DISCUSSÃO.....	88
6. CONCLUSÕES	99
7. ANEXOS	100
8. REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental desde o isolamento das GW-CTM até o ensaio funcional	19
Figura 2 - Esquema do ensaio funcional de cocultura de GW-TM com PBMC estimulado com PHA.....	31
Figura 3 - Estratégia de análise de proliferação de células T	33
Figura 4 - Morfologia celular heterogênea das GW-CTM em passagens precoces (P0 - P2)	42
Figura 5 - Células-tronco mesenquimais de geleia de Wharton	42
Figura 6 - Fenotipagem de GW-CTM.....	44
Figura 7 - Porcentagem de positividade dos marcadores de superfície	44
Figura 8 - Imunofenotipagem das GW-CTM - porcentagem de positividade dos marcadores de superfície	45
Figura 9 - Diferenciação de CTM em adipócito e osteócito	46
Figura 10 - Duplicação da população de GW-CTM	49
Figura 11 - Tempo de duplicação da população de GW-CTM.....	50
Figura 12 - Senescência replicativa em GW-CTM	52
Figura 13 - Expressão de genes associados à via da p53 em GW-CTM	55

Figura 14 - Expressão gênica basal de moléculas imunomoduladoras em GW-CTM	57
Figura 15 - Secreção de IL-6, IL-8 e IL-11 em GW-CTM	61
Figura 16 - Inibição da proliferação de LT totais CD3 ⁺ mediada por GW-CTM	64
Figura 17 - Inibição da proliferação de LT CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ mediada por GW-CTM.....	66
Figura 18 - Expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em CTM cultivadas com PBMC estimulado com PHA	69
Figura 19 - Inibição da proliferação de LT totais CD3 ⁺ mediada por GW-CTM tratadas com IFN- γ em P5 e P10	73
Figura 20 - Inibição da proliferação de LT CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ mediada por GW-CTM tratadas com IFN- γ em P5 e P10.....	75
Figura 21 - Expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em GW-CTM estimuladas com IFN- γ em P5 e P10 cultivadas com PBMC.....	78
Figura 22 - Secreção de moléculas imunomoduladoras após GW-CTM estimulada com IFN- γ em P5 e P10 cultivada com PBMC	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados na citometria28

Tabela 2 – Perfil de células do sistema imune nas amostras de PBMC que foram utilizadas no ensaio funcional 29

Tabela 3 - Sondas TaqMan utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real 35

Tabela 4 - Amostras coletadas e protocolos de isolamento testados41

Tabela 5 - Valores de P das comparações múltiplas entre passagens, por indivíduo da secreção de IL-6, IL-8 e IL-11 em GW-CTM62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
Ct	Do inglês, <i>cycle threshold</i> / Limiar do ciclo
CTM	Células-tronco mesenquimais
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EPM	Erro padrão da média
GW	Geleia de Wharton
HGF	Do inglês, <i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	Do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LIF	Do inglês, <i>leukemia inhibitor factor</i>
LT	Linfócitos T
MO	Medula óssea
NK	Do inglês, <i>Natural Killer</i>
Oligo-dT	Oligo-desoxitimidina
PBMC	Do inglês, <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> / Tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandina
PHA	Do inglês, <i>phytohemagglutinin</i>
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
RNA _m	RNA mensageiro
SBF	Soro bovino fetal
TGF	Do inglês, <i>transforming growth factor</i>
TLR	Do inglês, <i>Toll-like receptor</i>
TNF	Do inglês, <i>tumor necrosis factor</i>
Treg	Células T reguladoras

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
cm	Centímetro
g	Força centrífuga relativa (=RCF)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma

Vieira Paladino F. *Potencial imunomodulador de células-tronco mesenquimais humanas de geleia de Wharton submetidas à senescência replicativa* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (GW-CTM) exibem a capacidade de modular a resposta das células T e geralmente esses efeitos imunomoduladores são anti-inflamatórios. Devido ao seu potencial imunossupressor, as CTM emergiram recentemente como uma ferramenta promissora para terapia celular. No entanto, essas células têm uma vida útil limitada *in vitro*, com redução progressiva da sua capacidade de autorrenovação e parada irreversível do ciclo celular. O resultado deste processo é a perda da funcionalidade das CTM, o que limita a sua utilização para fins terapêuticos. Pouco se sabe sobre a variabilidade individual das amostras de GW-CTM e como isso poderia afetar sua expansão *in vitro*, seu potencial imunomodulador e o processo de envelhecimento. Neste estudo, avaliamos o perfil de citocinas imunomoduladoras e a capacidade das GW-CTM inibir a proliferação de células T durante o processo de senescência replicativa para determinar se a resposta esperada é afetada. **MÉTODOS:** GW-CTM foram cultivadas até a senescência replicativa ser atingida; as amostras foram coletadas numa fase inicial (passagem 5), numa etapa intermediária (passagem 15) e na senescência replicativa (passagem geralmente entre 20 e 25) para análise do perfil basal de moléculas imunomoduladoras. GW-CTM foram cocultivadas com amostras de duas células mononucleares de sangue periférico (PBMC), obtidas de doadores de plaquetas saudáveis. PBMC foi estimulado com fitohemaglutinina (PHA) durante 72 horas e cocultivado com três amostras de GW-CTM diferentes para medir a supressão da proliferação das células T. Os experimentos foram realizados utilizando as passagens P5 e P10. As análises foram feitas por PCR em tempo real, western blot e citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Nossos resultados mostram que a expressão gênica e a secreção de moléculas imunomoduladoras variam entre amostras de GW-CTM, sem padrão específico. Em cocultura, todas as GW-CTM foram capazes de inibir a proliferação de

células T CD3⁺ ativadas por mitogéno, embora em diferentes graus. E cada PBMC respondeu à cocultura com um nível diferente de inibição. Além disso, o perfil imunomodulador de todas as GW-CTM foi essencialmente mantido, mesmo após várias passagens. CONCLUSÃO: Nossos dados indicam que cada GW-CTM exibe um comportamento único, diferindo nos padrões de expressão e secreção de citocinas e capacidade imunomoduladora. Essa variabilidade intrínseca entre amostras pode influenciar a eficácia de GW-CTM quando utilizadas em terapia celular.

Descritores: células-tronco; imunomodulação; geleia de Wharton; senescência; linfócitos T; cordão umbilical.

Vieira Paladino F. *Immunomodulatory potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly progressing to replicative senescence* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

SUMMARY

INTRODUCTION: Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSC) exhibit the ability to modulate T cell responses and these immunomodulatory effects are usually anti-inflammatory. Due to their immunosuppressive potential, MSC have recently emerged as a promising tool for cell therapy. However, MSC have a limited lifespan *in vitro*, with a progressive reduction in their capacity for self-renewal leading to irreversible arrest of cell division. The result of this process is the loss of stem cell functionality, which limits its use for therapeutic purposes. Information on the variability of individual cell samples impacting upon *in vitro* expansion, immunomodulatory potential, and aging processes is still lacking. In this study, we evaluated the immunomodulatory cytokine profile and capacity to inhibit T cell proliferation of WJ-MSC progressing to replicative senescence to determine if the expected response is affected. **METHODS:** WJ-MSC were cultured until replicative senescence was reached and the samples were collected at an early stage (passage 5), at an intermediate stage (passage 15), and in replicative senescence (passage generally between 20 and 25) to analyze the basal profile of immunomodulatory molecules. WJ-MSC were co-cultured with samples from the same two peripheral blood mononuclear cells (PBMC), obtained from healthy platelet donors. PBMC were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) for 72 hours and tested against 3 different WJ-MSC to measure suppression of T cell proliferation. The experiments were performed using passages P5 and P10. Analyses were done by real-time PCR, western blot, and flow cytometry. **RESULTS:** Our results show that gene expression and secretion of immunomodulatory molecules varied among WJ-MSC samples with no specific pattern discernible. In co-culture all WJ-MSC were capable of inhibiting mitogen-activated CD3⁺ T cell proliferation, although to different extents and each PBMC responded with its unique level of inhibition. In addition, the immunomodulatory profile of each WJ-MSC sample was essentially maintained

even after several passages. CONCLUSION: Our results indicate that each WJ-MSC displays a unique behavior, differing in patterns of cytokine mRNA expression and immunomodulatory capacity. The intrinsic variability between samples may influence the effectiveness of WJ-MSC when employed therapeutically.

Descriptors: stem cells; immunomodulation; Wharton jelly; aging; T-Lymphocytes; umbilical cord

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM), descritas há mais de 50 anos por Friedenstein e colaboradores (Friedenstein et al. 1968), são células estromais adultas multipotentes e têm como principais funções a capacidade de proliferação, autorrenovação e diferenciação em diversos tipos celulares (Uccelli et al. 2008). As CTM promovem o restabelecimento da homeostase, realizando a manutenção e reparo dos tecidos, tanto sob o aspecto estrutural como funcional. Além disso, diversos estudos descrevem as CTM como células imunoprivilegiadas ou hipo-imunogênicas, porque expressam baixos níveis de MHC de classe I e moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86, e não expressam MHC classe II (Kalaszczynska et al. 2015). Estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici et al. 2006), os principais critérios que definem e caracterizam as CTM in vitro são: a) as células devem ser aderentes ao plástico em condições-padrão de cultivo; b) as células devem ter o potencial comprovado de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos; c) as células devem exibir em sua superfície um perfil de expressão molecular específico (Horwitz et al. 2005). Um conjunto de moléculas de superfície é utilizado para definir as CTM (Tabela 1), as células devem ser positivas para CD29, CD73, CD90, CD44 e CD166 e negativas para CD14, CD34, CD45 e HLA-DR.

As CTM podem ser encontradas em praticamente todos os tecidos do corpo. Considerada como o "padrão-ouro" para obtenção de CTM, a medula óssea (MO-CTM) é a mais utilizada em ensaios clínicos (Owen 1988; Bianco et al. 2001), porém o uso destas células nem sempre é recomendado, devido ao alto grau de exposição viral, possibilidade de morbidade do doador, alteração da capacidade proliferativa e diferenciação *in vitro*, por diferenças de idade de doadores (Stenderup et al. 2003) e procedimento de obtenção altamente invasivo.

Por isso, outras fontes vêm sendo bastante estudadas, como as CTM de parede do cordão umbilical (geleia de Wharton – GW-CTM), sangue de cordão umbilical, tecido adiposo removido por lipoaspiração (TA-CTM), polpa de dente de leite e cartilagem articular (Prockop 1997; Beyer Nardi and Da Silva Meirelles 2006). As CTM derivadas da geleia de Wharton são consideradas como uma alternativa potencial à medula óssea e outros tecidos, devido a facilidade de isolamento, maior potencial de expansão em cultura e maior acessibilidade as amostras com poucas preocupações éticas. Além de serem células de idade muito jovem (neonatal) e por isso, terem sofrido menos interferência ambiental. A geleia de Wharton (GW) é composta por tecido conjuntivo mucoide que envolve os três vasos umbilicais (2 artérias e uma veia), é cercada externamente por uma camada única de células epiteliais amnióticas e essas estruturas principais constituem o cordão umbilical humano. Quando a GW foi descoberta por Thomas Wharton em 1656, acreditava-se que seu papel mais importante era funcionar de maneira semelhante ao sistema de transporte linfático. No entanto, estudos posteriores mostraram a ausência de um sistema vascular e descreveram as funções de apoiar e proteger os vasos umbilicais da GW.

Recentemente, o interesse crescente por amostras de cordão umbilical humano, em particular da GW, como fonte de obtenção de CTM, levou a investigações adicionais sobre a estrutura do tecido. A GW é dividida em três zonas principais, com base em sua aparência histológica: 1) o subamínio, com uma população escassa de células semelhantes a fibroblastos, funcionalmente ativa; 2) região intermediária da GW, constituída por matriz extracelular (predominantemente colágeno tipo I) e 3) região perivascular (ou intervascular), que concentra a maior porção de células da GW. Além disso, alguns autores já mostraram que a GW é constituída por fontes distintas da camada germinativa durante o desenvolvimento embrionário, o que pode ser verificado pela presença de diferentes estágios de diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos em cortes histológicos de GW. A zona perivascular, provavelmente originada a partir do mesoblasto, é o local mais rico em GW-CTM, uma vez que este subconjunto celular expressa marcadores relevantes que caracterizam CTM (Davies et al. 2017). Encontrar uma fonte celular adequada é um grande desafio para a terapia celular e engenharia de tecidos.

1.2. Imunomodulação

Juntamente com a sua capacidade de diferenciação em células da linhagem mesodérmica e sua alta capacidade proliferativa, as CTM também apresentam uma característica importante, a sua capacidade imunomoduladora (Weiss et al. 2008; Hoogduijn et al. 2010). Quando um tecido é danificado, ocorre

inflamação e as CTM são mobilizadas para o local da lesão. Por seu potencial multipotente, acreditava-se que as CTM recrutadas se diferenciavam em células funcionais para substituir as células danificadas. No entanto, em resposta a citocinas inflamatórias, as CTM ajudam a preparar o microambiente, produzindo fatores imunorreguladores que modulam a progressão da inflamação (Wang et al. 2014).

O consenso atual é que os benefícios mais promissores das CTM ocorrem em pacientes que apresentam patologias agudas com forte componente inflamatório (Le Blanc et al. 2008; Németh et al. 2009). Assim, os efeitos imunomoduladores das CTM podem ter papel importante na melhora de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla, doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), além de evitar a rejeição de transplantes de órgãos. Baseados em mais de 40 anos de experiência acumulada nas rotinas de transplante de medula óssea e na promessa do potencial de diferenciação das CTM, cientistas propuseram o uso das CTM para regeneração de danos teciduais em diversas condições patológicas (Lazarus et al. 1995). Os estudos utilizaram células autólogas (medula óssea, tecido adiposo), células alogênicas (cordão umbilical) ou uma mistura de ambas. Em sua grande maioria, estes ensaios que empregaram células preparadas com um mínimo de manipulação mostraram resultados, de modo geral, decepcionantes. A duração das células *in vivo* é excessivamente curta e é muito difícil direcioná-las em quantidades significativas para o órgão lesado, sendo necessária a infusão local, repetidas vezes. Após a infusão das células, a transdiferenciação em células funcionais raramente ocorre *in loco* nos tecidos. A aparente incongruência entre o benefício alcançado nesta situação e a ausência de diferenciação em células

especializadas do tecido-alvo, levou à descoberta da surpreendente capacidade imunossupressora das CTM.

Os resultados mais promissores, relatados pelo grupo de K. Le Blanc, foram obtidos com um protocolo de tratamento da DECH, usando CTM de fonte alogênica (sangue de cordão umbilical). As CTM foram capazes de reverter o quadro da DECH parcial ou totalmente em 50% dos pacientes tratados (Ringdén and Le Blanc 2011). Já o grupo encabeçado por F. Dazzi (Krampera et al. 2003) e outros pesquisadores (Nicola et al. 2002; Le Blanc 2003; Aggarwal and Pittenger 2005) buscaram desvendar os mecanismos imunomoduladores das CTM originárias da medula óssea. A manutenção da capacidade imunossupressora das CTM de medula óssea humana foi monitorada durante o processo de diferenciação das CTM nos três protocolos básicos (Le Blanc et al. 2003). Nesse estudo, a capacidade imunossupressora foi mantida por até duas semanas em meios de diferenciação, mesmo havendo a expressão de HLA de classe II induzida por IFN- γ em 10% das células. A capacidade imunossupressora foi inclusive aumentada quando as CTM foram pré-incubadas com IFN- γ , antes da cocultura com os linfócitos T.

1.2.1 Interação das CTM com células do sistema imune

Muitos estudos mostraram que as CTM podem regular a ativação e a função de células imunes, como os linfócitos T e B (Uccelli et al. 2006; Tabera et al. 2008; Griffin et al. 2010), as células dendríticas (DC) (Jiang et al. 2005), os monócitos/macrófagos (Cho et al. 2014) e as células Natural Killer (NK)

(Spaggiari et al. 2006). Os efeitos das CTM sobre as células do sistema imune são geralmente anti-inflamatórios. Entre os estudos, as células T são as mais investigadas (Nicola et al. 2002; Tse et al. 2003; Sheng et al. 2008). Alguns mecanismos já foram descritos mostrando a interação das CTM com as células T. Uma infinidade de estudos tem demonstrado que as CTM podem suprimir a ativação das células T em vários pontos da resposta imune, incluindo sobrevivência, ativação e diferenciação de suas subpopulações, relatada pela primeira vez em 1998. Esta inibição afeta a proliferação de células T induzida por aloantígenos (Potian et al. 2003; Tse et al. 2003), mitógenos (Nicola et al. 2002), bem como a ativação por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 (Krampera et al. 2003). Um estudo mostrou que as CTM humanas são capazes de suprimir a proliferação de células T, em cultura mista de linfócitos (MLR) ou induzida por fitohemaglutinina (PHA) (Nicola et al. 2002). MO-CTM podem inibir a produção de TNF- α e IFN- γ por células T CD4⁺ e T CD8⁺, aumentando a produção de IL-10 e restaurando a produção de IL-4 por essas células (Zheng et al. 2008). Outro possível mecanismo de supressão imunológica é a anergia de células T induzida por CTM. As CTM podem induzir anergia em células T suprimindo a expressão de ciclina D2 e inibindo a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ através da produção de óxido nítrico (Glennie et al. 2005; Ren et al. 2008). Além disso, já foi descrito que as CTM podem induzir apoptose de células T. Por exemplo, as CTM podem induzir a apoptose de células T através da via apoptótica Fas/FasL, as células apoptóticas estimulam os macrófagos a secretar altos níveis de TGF- β , que por sua vez leva à indução da geração de células T reguladoras (Treg) (Akiyama et al. 2012). Outro mecanismo de regulação da resposta imune é a indução de células T reguladoras pelas CTM, são células que auxiliam na

manutenção da homeostase do tecido, principalmente por meio da regulação da resposta imune. Um aumento na população de células T CD4⁺ CD25^{high}, exibindo um fenótipo regulador (isto é, positivas para o fator de transcrição FoxP3) foi demonstrado em culturas de PBMC estimuladas por mitógenos na presença de CTM (Aggarwal and Pittenger 2005; Maccario et al. 2005), embora as propriedades funcionais das células Treg não tenham sido mostradas. A ativação de TLR3 e TLR4, ambos expressos constitutivamente em CTM, aumentam a geração de células Treg. Além disso, foi demonstrado que, apesar da presença de fatores solúveis serem importantes para indução de Treg por CTM, o contato célula-célula é essencial para mudança de perfil celular regulador em linfócitos T CD4⁺ (Rashedi et al. 2017). Ainda neste mesmo estudo, as Treg induzidas por CTM ativadas via TLR apresentavam perfil imunossupressor, com expressão elevada de RNAm de TGF- β 1 e IL-10 e expressão reduzida de RNAm de IFN- γ e TNF- α .

A interação com outras células do sistema imune já foi descrita. Os macrófagos podem ser polarizados em macrófagos com perfil M1 ou M2, dependendo de seu microambiente. Os macrófagos M1 têm uma forte atividade antimicrobiana, enquanto que os macrófagos M2 promovem a resolução da inflamação e o reparo tecidual ao liberar IL-10 e aumentam a depuração das células apoptóticas (Mosser and Edwards 2010). A cocultura de monócitos com MO-CTM humana promove a formação de macrófagos com perfil M2, que secretam níveis elevados de IL-10, ocorre aumento da atividade fagocitária e têm baixos níveis da produção de TNF- α e IFN- γ e expressão de MHC de classe II (Kim and Hematti 2009; François et al. 2012; Cho et al. 2014).

As DC desempenham um papel importante na indução da imunidade e da tolerância, dependendo de seu estágio de ativação e maturação (Rutella et al. 2006). As CTM interferem na diferenciação, na maturação e na função das DC (Jiang et al. 2005). As DC geradas na presença de CTM perdem a capacidade de induzir a ativação de células T. Além disso, as CTM suprimem a diferenciação de DC, resultando na formação de DC imaturas que exibem um fenótipo supressor ou inibitório (Zhang et al. 2004; Nauta et al. 2006; Spaggiari et al. 2009).

As células NK exibem atividade citotóxica que se destina principalmente a células que não têm expressão de moléculas HLA de classe I. Estudos mostraram que as CTM suprimem a proliferação de células NK induzida por IL-2 e a produção de IFN- γ (Rasmusson et al. 2003; Sotiropoulou et al. 2006), além de diminuir o potencial citotóxico destas células (Mauro Krampera et al. 2006).

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos e por isso têm papel importante na imunidade humoral. Um estudo mostrou que as CTM inibem a proliferação de células B ativadas, a diferenciação e produção de anticorpos, além de afetar o seu comportamento quimiotático (Corcione et al. 2006).

1.2.2. Moléculas envolvidas no potencial imunomodulador das CTM

Além do efeito imunomodulador por contato célula-célula, experimentos realizados com membrana de “*transwell*” (experimento sem contato) mostraram

supressão na proliferação de células T, demonstrando que as CTM também exercem a imunomodulação secretando fatores solúveis (Nicola et al. 2002; Tse et al. 2003). No entanto, a produção de fatores solúveis imunomoduladores é dependente de um “*cross-talk*” entre as CTM e as células do sistema imune ativadas, uma vez que o uso de sobrenadantes da cultura de CTM não é suficiente para suprimir a proliferação de células T (Le Blanc et al. 2004; Augello et al. 2005). Um estudo comparando quatro fontes de CTM (medula óssea, tecido adiposo, sangue de cordão umbilical e geleia de Wharton), mostrou que cada fonte secreta quantidades diferentes de moléculas imunomoduladoras, porém essa diferença não impactou na capacidade das células de suprimirem a proliferação de células T induzida por mitogénos (K H Yoo et al. 2009).

Os efeitos terapêuticos das CTM dependem de sua capacidade de regular a inflamação e a manter a homeostasia dos tecidos, através de um conjunto de fatores imunoreguladores, como citocinas, fatores de crescimento e fatores de diferenciação. Diversas moléculas estão envolvidas no potencial imunomodulador das CTM, como por exemplo, TGF- β 1 (do inglês *transforming growth factor*) (Nasef et al. 2007), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) (Yang et al. 2009), HGF (do inglês *hepatocyte growth factor*) (Neuss et al. 2004), prostaglandina E2 (PGE2) (Chen et al. 2010) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Xu et al. 2007). Juntos, estes fatores secretados podem inibir a resposta inflamatória, suprimindo a atividade das células do sistema imune, promovendo a proliferação de células endoteliais e fibroblastos que auxiliam no reparo tecidual e remodelamento de matriz extra celular e induzindo a diferenciação de células progenitoras do tecido.

A IL-10 é caracterizada pelo seu efeito anti-inflamatório associado à indução da tolerância imunológica. A IL-10 suprime as funções de macrófagos e neutrófilos (Mocellin 2005), inibe a resposta imune de células Th1 (O'Garra and Vieira 2007), suprime a secreção de citocinas pró-inflamatórias por DC (Opal and DePalo 2000), induz anergia em linfócitos T (Kubsch et al. 2003) e estimula a expressão de moléculas anti-inflamatórias (Iyer and Cheng 2012). Além disso, a IL-10 é uma das citocinas relacionadas com a geração das células Tregs (Chaudhry et al. 2011). No caso das CTM, a secreção de IL-10 é bastante contraditória. Alguns estudos mostram a presença da secreção de IL-10 por CTM, e outros mostram ausência. As CTM podem secretar IL-10 sob condições específicas, como em ambientes inflamatórios e na presença das citocinas IFN- γ , IL-1 β e TNF- α . Um estudo observou um aumento na fração de linfócitos T CD4⁺ FoxP3⁺ na subpopulação de células T CD4⁺ cultivadas em meio condicionado de CTM (Ivanova-Todorova et al. 2012).

Conhecida como uma citocina pleiotrópica, TGF- β regula múltiplas funções celulares fundamentais, incluindo proliferação, diferenciação, migração, adesão celular e apoptose, que afetam inúmeros processos biológicos (Li et al. 2006). Além disso, TGF- β desempenha funções anti-inflamatórias. TGF- β 1 é constitutivamente produzida por CTM como um mediador das suas propriedades imunomoduladoras. Um estudo mostrou que TGF- β 1 estava envolvido na inibição por contato da proliferação de células T por CTM (Nasef et al. 2007). O potencial supressor das CTM de polpa de dente foi neutralizado com anticorpo anti-TGF- β em cocultura com PBMC (Tomic et al. 2010). O TGF- β produzido pelas CTM também pode induzir a geração de células Tregs (Fu et al. 2004).

IDO é uma enzima que possui efeitos imunossupressores e antimicrobianos, ela cataboliza o triptofano, levando à inibição da proliferação de linfócitos T, seja pela exaustão desse aminoácido do ambiente ou levando as células T à apoptose. IDO é considerado um dos principais imunossupressores produzidos por CTM (Meisel et al. 2004). As CTM não ativadas normalmente expressam baixos níveis de IDO, mas após o estímulo com citocinas inflamatórias, principalmente IFN- γ , ocorre aumento dos níveis de RNAm de IDO (Nicola et al. 2002; Liang et al. 2013). IDO é expressa por diversas fontes de CTM, como medula óssea, placenta, cordão umbilical e de polpa de dente (Chang et al. 2006; Jones et al. 2007). A inibição da atividade de IDO suprime parcialmente a atividade imunossupressora de CTM de medula óssea e de placenta na proliferação de linfócitos T (M Krampera et al. 2006). Outro estudo mostrou que a atividade enzimática do IDO estava parcialmente envolvida na determinação do perfil de monócitos obtidos de PBMC, em macrófagos imunossupressores M2 que secretam IL-10 (François et al. 2012).

As prostaglandinas (PG) são produtos da síntese de ciclooxigenase (COX) a partir de ácido araquidônico no processo inflamatório. A COX2 dá origem preferencialmente a prostaglandina E2 (PGE2) (Brock et al. 1999). Juntamente com o IDO, a PGE2 é outra importante molécula efetoradora responsável pelo potencial imunomodulador das CTM (Spaggiari et al. 2008; Hsu et al. 2013). As CTM produzem constitutivamente níveis detectáveis de PGE2 (Spaggiari et al. 2009). Um estudo "*in vitro*" chamou a atenção para a importância da prostaglandina E2 (PGE2) secretada durante a ação imunomoduladora (Chen et al. 2010). Quando células NK foram cultivadas com CTM na presença de um inibidor que bloqueia a atividade de IDO, a proliferação de células NK foi

parcialmente restaurada, enquanto que o bloqueio de ambos, IDO e PGE2, restaura completamente a proliferação de células NK mostrando, assim, que IDO e PGE2 atuam sinergicamente para mediar os efeitos inibitórios de CTM na proliferação das células NK (Spaggiari et al. 2008).

LIF (do inglês *leukemia inhibitor factor*) é uma citocina que tem a capacidade de inibir a proliferação da linhagem leucocitária mieloide. O LIF desempenha um papel essencial no estabelecimento da gravidez, impede a rejeição do feto pelo organismo da mãe (Piccinni et al. 2001), prolonga a sobrevivência de enxerto de pele alogênica em camundongos e está relacionado à tolerância ao transplante (Metcalf et al. 2005). Nasef e colaboradores mostraram o envolvimento de LIF na inibição da proliferação de células T e na geração de células Treg por MO-CTM. Quando foi utilizado um anticorpo para neutralizar a ação de LIF, eles observaram a restauração da capacidade proliferativa dos linfócitos e diminuição de células Treg (Nasef et al. 2008).

Entre as citocinas produzidas por CTM encontra-se a IL-11, que desperta interesse especial devido à sua ação imunossupressora e na diferenciação celular. A IL-11 pertence à família IL-6 de citocinas que têm em comum o uso da cadeia gp130 como co-receptor e inclui também LIF, oncostatina-M, fator ciliar neurotrófico (CNTF) e cardiotrofina-1 (Heinrich et al. 2003). Num estudo em modelo murino de esclerose múltipla (EAE), a IL-11 mostrou ser imunossupressora, diminuindo a gravidade da doença quando administrada *in vivo* e diminuindo a ativação de linfócitos T CD4⁺ em ensaios *in vitro* (Gurfein et al. 2009). Em modelo de insuficiência hepática, a IL-11 induziu a produção de hemeoxigenase-1, suprimiu a produção de citocinas pró-inflamatórias hepáticas e protegeu contra as lesões induzidas pelo tetracloreto de carbono (Kawakami

et al. 2006). Ensaios pré-clínicos usando IL-11 levaram à melhora da fibrose pós-infarto do miocárdio, atenuando a disfunção cardíaca e diminuindo morte celular dos cardiomiócitos (Obana et al. 2010). Baseada em sua atividade promotora de trombopoiese, uma versão recombinante da IL-11 existe comercialmente sob o nome de Oprelvekin (Neumega®). No entanto, além da falta de consenso quanto às suas diferentes ações pouco se sabe sobre a função dessa citocina em GW-CTM.

As CTM apresentam diferentes perfis de expressão gênica não só conforme a fonte das células (Panepucci et al. 2004), mas também existe variação individual. Um estudo comparando MO-CTM e células estromais de sangue de cordão umbilical (CE-SCU) mostrou haver diferenças importantes quanto à produção basal de citocinas (Kögler et al. 2005). Neste estudo, CE-SCU apresentaram níveis aumentados de LIF, IL-11 e HGF cerca de 4, 3 e 1,5 vezes, respectivamente, quando comparados à produção por MO-CTM. Por outro lado, nestas últimas havia aumento de IL-6 em comparação às CE-SCU. É importante salientar que os valores para um mesmo tipo celular eram muito variáveis (em torno de 30%, mas podendo chegar a 80%), especialmente no caso de IL-11 e HGF. A avaliação da expressão dos genes durante o processo de diferenciação de MO-CTM em osteócitos e adipócitos, numa análise semiquantitativa por RT-PCR, indicou perda gradual da expressão gênica destas citocinas imunomoduladoras ao longo do processo de diferenciação (Hyun et al. 2005). Vale ressaltar que os resultados acima citados se referem a CTM obtidas de medula óssea e/ou de sangue de cordão. Existem poucos estudos com CTM oriundas da parede umbilical.

Apesar do potencial imunomodulador das CTM originárias da medula óssea ser bem conhecido, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais, mais especificamente, as GW-CTM modulam a resposta imune e, principalmente, como o seu perfil constitutivo pode afetar seu próprio comportamento.

1.3. Plasticidade das CTM

As CTM são capazes de adotar um fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório dependendo do microambiente, interferindo nas respostas imunes inatas e adaptativas tanto *in vitro* como *in vivo*. Sob condições de hipóxia em cultura, o estímulo com as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-1 β aumenta a expressão de TLR2, TLR3 e TLR4 (do inglês Toll-like receptors – TLR) em MO-CTM, deixando as CTM mais sensíveis ao meio inflamatório (Raicevic et al. 2010). Waterman e colaboradores sugeriram que as CTM podem adquirir dois fenótipos com ações distintas após estímulo com os ligantes de TLR3 e TLR4, resultando em diferentes efeitos imunomoduladores. A população de CTM estimulada com LPS (ligante de TLR4) exibiu um perfil pró-inflamatório e a população de CTM ativada com poly(I:C) (ligante de TLR3) apresentou um perfil anti-inflamatório (Waterman et al. 2010). De maneira semelhante ao que ocorre com macrófagos, passou-se a usar a nomenclatura MSC1 e MSC2 para a polarização das CTM em células pró ou anti-inflamatórias, respectivamente.

As atividades pró-inflamatórias das CTM podem ser benéficas na fase inicial da inflamação e ajudar na montagem de uma resposta imune adequada. Alguns estudos sugerem que estes efeitos estimuladores só ocorrem quando as CTM estão expostas a níveis insuficientes de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ . Nestas condições, as CTM humanas produzem pouco IDO que é insuficiente para suprimir a proliferação de células T (Ren et al. 2008; Li et al. 2012; Shi et al. 2012).

Quando expostas a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, as CTM adotam um fenótipo imunossupressor para atenuar a inflamação e promover a homeostase do tecido. A cocultura de monócitos com MO-CTM promove a polarização de macrófagos M2 (Eggenhofer and Hoogduijn 2012), dependendo tanto do contato célula-célula quanto de fatores solúveis, incluindo PGE2 e da atividade de IDO (Németh et al. 2009). A produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos M1 ou células T ativadas, pode ativar as CTM que liberam mediadores que levam a diferenciação de monócitos em direção a um perfil anti-inflamatório (Le Blanc and Mougikakos 2012). Além da polarização das CTM, a polarização de macrófagos fornece um mecanismo suplementar para manter o equilíbrio entre os efeitos pró e anti-inflamatórios. Além disso, este efeito das CTM em macrófagos também está relacionado com sua capacidade de favorecer a geração de células Treg, envolvidas na imunossupressão.

1.4. Senescência X Terapia Celular

Devido ao seu potencial imunossupressor e a capacidade de manter e reparar os tecidos (Augello and De Bari 2010; Hoogduijn et al. 2010), as CTM emergiram recentemente como uma ferramenta promissora para terapia celular. Porém, as CTM têm uma duração limitada in vitro, como qualquer célula somática. É sabido que passagens seriais em cultura levam à diminuição da capacidade de autorrenovação e diferenciação das CTM, o que sem dúvida limitaria seu uso em terapia celular (Baxter et al. 2004; Bonab et al. 2006; Wagner et al. 2008). Após diversas passagens in vitro, as células atingem um estágio conhecido como senescência celular ou replicativa. A senescência é o resultado de um processo de envelhecimento, em que ocorre uma parada irreversível na divisão celular onde as células senescentes permanecem vivas, apesar de um desarranjo das suas funções (Itahana et al. 2001).

As células-tronco residentes nos tecidos participam da manutenção do equilíbrio entre perda e reposição celular. Contudo, ao longo da vida, esse equilíbrio passa a ser gradativamente perdido e o número de células recém-diferenciadas é incapaz de compensar aquelas que foram perdidas. Essa perda fisiológica da homeostase dos tecidos é geralmente concomitante com um declínio do desempenho físico e cognitivo de todo o organismo, ao qual denominamos envelhecimento. Além disso, as células diferenciadas podem tornar-se incapazes de desempenhar suas funções normais, tornam-se senescentes e finalmente, são eliminadas por morte celular. Estes eventos decorrem de uma série de modificações que ocorrem nas células, como o

acúmulo de dano no DNA, a redução do comprimento dos telômeros que ocorre depois de repetidos ciclos celulares, com aumento de estresse oxidativo e a produção e o acúmulo de proteínas mal empacotadas (Turinetti et al. 2016). Quando não eliminadas, essas mesmas células podem contribuir ao surgimento de doenças como o câncer e a autoimunidade (Wagner et al. 2008).

A proteína supressora de tumor p53 representa um ponto chave no controle do ciclo celular, além de atuar na transcrição de genes importantes, como p16 e p21, para resposta adequada em situações como interrupção da replicação, reparo de DNA e apoptose. Por isso, a ativação da via de p53 é um dos mecanismos acionados durante o processo de senescência, em que há interrupção da divisão celular, porém, a célula se mantém metabolicamente ativa (Itahana et al. 2001). O melhor entendimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de senescência de células-tronco pode, então, fornecer informações importantes sobre o envelhecimento do organismo.

Essa avaliação pode ser de grande importância ao se decidir utilizar essas células em terapia celular (Gazit et al. 2008; Wagner et al. 2009). As várias aplicações terapêuticas envolvendo CTM requerem um passo inicial de expansão *in vitro* antes de seu uso, geralmente centenas de milhões de células são utilizadas por tratamento. Diversos trabalhos avaliam a capacidade imunomoduladora das GW-CTM apenas em passagens iniciais, não há dados na literatura sobre seu comportamento após diversas passagens até se obter quantidade suficiente de células para se utilizar em terapia celular.

A parede do cordão umbilical é uma fonte acessível de CTM, cujas características de produção de moléculas imunomoduladoras e funcionalidade foram pouco estudadas. O desenvolvimento de protocolos para possível

utilização terapêutica destas CTM requer tais estudos, bem como de variações que ocorrem ao longo dos procedimentos de sua expansão *in vitro* e de seu processo de envelhecimento. Vale ressaltar que, mesmo utilizando protocolos de isolamento padronizados e bem estabelecidos, alguns cordões não originaram populações de células tronco mesenquimais, isso pode estar relacionado com a variabilidade intrínseca observada em células de mesma fonte obtidas de doadores diferentes.

O objetivo do presente projeto é a avaliação do perfil constitutivo da produção de citocinas em GW-CTM indiferenciadas e em resposta à indução de senescência e investigar se as CTM de diferentes doadores, após um número variável de passagens em cultura mantém o mesmo potencial imunomodulador e se isso difere do doador para doador.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil e a variabilidade da produção de moléculas imunomoduladoras e o potencial imunossupressor em GW-CTM indiferenciadas e submetidas à senescência replicativa *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1) Determinar em GW-CTM, os perfis constitutivos de produção de moléculas imunomoduladoras, a saber, as interleucinas IL-1 α , IL1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11 e TGF- β 1, além de HGF, LIF e indoleamina 2,3 deoxigenase, no estado indiferenciado.

2.2.2) Avaliar os mesmos perfis após a sua expansão *in vitro* ao ser atingido o estado de senescência replicativa.

2.2.3) Efetuar a avaliação funcional das GW-CTM em ensaios de imunossupressão frente a cocultura alogênica com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA).

2.2.4) Efetuar a avaliação funcional das GW-CTM após tratamento com IFN- γ , em ensaios de imunossupressão frente a cocultura alogênica com PBMC estimuladas com PHA.

2.2.5) Efetuar a avaliação funcional das GW-CTM em passagem precoce e tardia, em ensaios de imunossupressão frente a cocultura alogênica com PBMC estimuladas com PHA.

2.2.6) Avaliar a produção e secreção de moléculas imunomoduladoras após os ensaios funcionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Figura 1. Desenho experimental desde o isolamento das GW-CTM até o ensaio funcional.

3.2. Aspectos éticos

Todas as amostras foram coletadas após obtenção de consentimento livre e informado e obedeceram aos critérios éticos estabelecidos (CAAE 17079113.4.0000.0071) pelo Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

3.3. Obtenção das amostras

3.3.1. CTM de cordão umbilical

Após a retirada do sangue, o cordão foi processado num período de até 4 horas após coleta, de acordo com protocolo estabelecido no Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa. Foram consideradas amostras saudáveis, quando obedecendo aos critérios de avaliação do Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical do HIAE.

Critérios de inclusão: Gestantes com idade acima de 18 anos e tempo de gravidez igual ou superior a 35 semanas. A bolsa não pode ter rompido há mais de 18 horas, a gestante deve ter realizado no mínimo duas consultas durante a gravidez e não deve ter infecção ou febre no momento do parto. Antes da coleta do sangue, os seguintes exames sorológicos são realizados, rotineiramente, na mãe: Hepatite A, B, C; HIV I e II, HTLV I e II, Citomegalovírus,

toxoplasmose, eletroforese de hemoglobina, doença de chagas e sífilis (ANVISA/RDC nº. 153/2004) e devem ser negativos ou dentro da faixa de normalidade.

3.3.2. CTM de medula óssea

As amostras de medula óssea de voluntários jovens e saudáveis foram obtidas de kits de coleta de medula óssea reutilizáveis e descartáveis. No próprio ato de doação para transplante, após a coleta e a filtragem das células da medula óssea, o filtro foi lavado com 20 mL de meio DMEM (5,6mM glicose) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) para recuperação das células que permaneceram retidas no interior do filtro, juntamente com coágulos sanguíneos e pequenos fragmentos ósseos (Deus et al. 2012).

Critérios de inclusão: os critérios utilizados para seleção do doador são determinados pela legislação nacional (Portaria 1353 do Ministério da Saúde) e por órgãos internacionais (Associação Americana de Bancos de Sangue), rigorosamente aplicados pelo Banco de Sangue do Hospital Israelita Albert Einstein. Para maiores informações consultar: <https://www.einstein.br/estrutura/banco-sangue>.

3.4. Protocolos de isolamento de GW-CTM testados

3.4.1. Protocolo 1

A veia do cordão umbilical foi canulada com auxílio de um escalpe e lavada com tampão fosfato salino 1X (PBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A veia foi preenchida com uma solução a 1% de colagenase tipo I (200 unidades/mg) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e o cordão foi colocado na estufa a 37°C por um período de uma hora. Após esse período, a veia foi lavada e o meio contendo as células foi centrifugado. O pellet foi ressuspensionado e semeado em meio DMEM (5,6mM glicose) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), antibiótico e antimicótico 100X (penicilina – 100 unidades/mL, estreptomicina – 100 µg/mL, anfotericina B - 250ng/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e L-Glutamina (2mM/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (Covas et al. 2003).

3.4.2. Protocolo 1 modificado

Foi utilizado o mesmo protocolo do item anterior, porém com aumento da concentração de colagenase de 1% para 4% (Covas et al. 2003).

3.4.3. Protocolo 2

O cordão foi triturado com bisturis em pedaços com um volume máximo de 5mm³. A digestão enzimática foi realizada com uma solução de 4% de collagenase tipo I (200units/mg) em DMEM sem suplementação, em seguida, os pedaços foram incubados durante uma hora a 37°C com agitação suave. Uma solução de DMEM com 50% SBF foi adicionada ao tecido enzimaticamente digerido. Este material foi filtrado para remover os restos de tecido, através de uma malha com poros de 250 µm, e foi feita uma lavagem com uma solução de DMEM com 5% de SBF. Após a centrifugação, o sedimento foi lavado duas vezes com DMEM suplementado e as células semeadas em meio DMEM (5,6mM glicose) suplementado com 10% SBF, antibiótico e antimicótico 100X (penicilina - 100 unidades/mL, estreptomicina - 100µg/mL, anfotericina B - 250ng/mL) e L-Glutamina (2mM/mL) e mantidas em incubadora umidificada, com 5% de CO₂, a 37°C (Seshareddy et al. 2008).

3.4.4. Protocolo 3 (explante)

O cordão foi cortado em pedaços pequenos de 1-2 mm e os pedaços foram transferidos para uma placa de cultura de 150cm². Após os pedaços aderirem na placa foi adicionado suavemente 30-35 mL de meio DMEM suplementado. Após 10-12 dias, os pedaços de tecido foram retirados da placa,

e as células aderidas foram tripsinizadas e transferidas para novos recipientes de cultura (Reinisch and Strunk 2009).

3.5. Isolamento de MO-CTM

A amostra de medula óssea obtida após filtração foi diluída (1:3) em PBS, sendo, em seguida, transferida para um tubo cônico de 50 mL contendo 20 mL de Ficoll-Paque (meio de centrifugação por densidade, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e centrifugada durante 30 minutos a 500g e 22°C. Após a centrifugação, as células foram transferidas para outro tubo e, novamente, centrifugadas por 5 minutos a 500 g e 22°C. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas com DMEM (5,6mM glicose) suplementado com 10% de SFB, para uma concentração final de 1×10^5 células/mL. Em seguida, as células foram cultivadas em frascos de 25cm², mantidos em incubadoras umidificadas a 37°C e 5% de CO₂, para favorecer a fixação das CTM no fundo do frasco (Deus et al. 2012). Para os ensaios, foram utilizadas células entre a quarta e quinta passagem.

3.6. Cultivo das GW-CTM e MO-CTM

As CTM foram semeadas utilizando a densidade de 4.000 células/cm² em meio de cultura DMEM (5,6mM glicose), suplementado com 10% SBF, antibiótico e antimicótico 100X (penicilina - 100 unidades/mL, estreptomicina - 100µg/mL, anfotericina - 250ng/mL) e L-Glutamina (2mM/mL) e mantidas em incubadora umidificada, com 5% de CO₂, a 37°C. A troca de meio de cultura foi realizada 3 vezes por semana. Quando as células em cultura atingiram 70-80% de confluência, foram lavadas com PBS 1X, foi adicionada a solução de Tryple Express 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e as células foram incubadas por 3 min a 37°C. Após esse período, foi adicionado DMEM suplementado com 10% de SBF e as células foram centrifugadas a 400g por 3 minutos e semeadas na densidade já citada.

3.7. Diferenciação adipogênica e osteogênica

Adipócito: as células foram semeadas na densidade de 10.000 células/cm² e cultivadas por 21 dias com meio e suplemento específico para diferenciação em adipócitos (StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit – Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Para confirmação da diferenciação das CTM em adipócitos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com óleo vermelho O (*OilRed O*).

Osteócito: as células foram semeadas na densidade de 1.500 células/cm² e cultivadas por 21 dias com meio e suplemento específico para diferenciação em osteócitos (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit – Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Para confirmação da diferenciação das CTM em osteócitos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com vermelho de Alizarina S 1% (1g/100ml).

A diferenciação das GW-CTM em osteócito e adipócito foi documentada por fotomicrografia das culturas coradas.

3.8. Congelamento e descongelamento de GW-CTM

As GW-CTM foram congeladas em diversas passagens para posterior descongelamento e realização dos experimentos. A suspensão de GW-CTM foi centrifugada 500g por 5 minutos e ressuspensa (5×10^5 células/mL) em solução de congelamento contendo 90% de SBF inativado e 10% DMSO (dimetilsulfóxido - Sigma, St. Louis, USA).

Para o descongelamento, os tubos foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente foram adicionados 10 mL de meio DMEM aquecido a 37°C, suplementado com 40% de SBF, até que o meio descongelasse totalmente. Após uma centrifugação a 500g por 5 minutos, a viabilidade celular foi determinada através do corante Azul de Tripán 0,4% (Sigma, St. Louis, USA). Para os ensaios, utilizamos células com viabilidade maior que 90% ao serem descongeladas.

3.9. Caracterização fenotípica de GW-CTM por citometria de fluxo

Para a caracterização imunofenotípica das CTM indiferenciadas, utilizamos os marcadores de superfície (BD Biosciences, San Jose, USA) descritos na tabela 1. Foram adicionadas 100.000 células/ poço em placa de 96 poços e centrifugadas a 500g por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL de tampão de lavagem de citometria (PBS + 1% SBF + 0,02% azida) e a placa foi centrifugada novamente. Após a lavagem, 100µL do mix de anticorpos monoclonais foram adicionados e incubados por 30 minutos, à 4°C, protegidos da luz. Após a incubação, a lavagem foi repetida e as amostras foram transferidas para os tubos de citometria. Os controles foram realizados a partir de amostras contendo células sem marcação para verificação de autofluorescência e de células marcadas com os isotipos controles correspondentes para verificação de marcação inespecífica. Foram adquiridos 10.000 eventos utilizando o citômetro BD-LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA). Realizamos a análise utilizando o programa FlowJo (Treestar, Ashland, OR), considerando a porcentagem de positividade de cada marcador de superfície.

Anticorpos	Características	Resultado esperado
CD90	Thy-1 - timócitos, neurônios, CTM	+
CD73	Ecto-nucleotidase - neurônios, células T ativadas, CTM	+
CD29	α 1-integrina - leucócitos, CTM	+
CD44	Pgp-1 - hemáceas, leucócitos e CTM	+
CD166	ALCAM - células epiteliais, células T e monócitos ativados, CTM	+
CD31	PECAM-1 - células endoteliais, monócitos, plaquetas, linfócitos B	-
CD34	Glicoproteína de membrana - precursores hematopoiéticos	-
CD45	Tirosina fosfatase - linfócitos T e B	-
CD106	VCAM-1 - células endoteliais	-
CD117	c-Kit - progenitores hematopoiéticos	-
HLA-DR	Molécula de MHC de classe II - macrófagos, linfócitos B	-
CD14	Proteína com domínio de leucina - macrófagos, neutrófilos e monócitos	-
CD133	Glicoproteína prominina 1 - precursores hematopoiéticos	-

Tabela 1. Anticorpos utilizados na citometria. Foram utilizados 14 anticorpos (BD) e controle isotópico e controle negativo com as células não marcadas.

3.10. Caracterização da senescência replicativa

As GW-CTM foram mantidas em cultura realizando as passagens das células sempre na mesma densidade. As células foram consideradas como tendo atingido a fase de senescência replicativa quando a contagem de células durante a passagem foi igual ou menor que a quantidade semeada inicialmente. A capacidade proliferativa foi registrada durante este processo através do cálculo de duplicação da população (PD) $N_H/N_I=2^X$, ou $[\text{Log}_{10}^{N_H} - \text{Log}_{10}^{N_I}]/\text{Log}_{10}^2 = X$, onde N_H é o número de células recolhidas e N_I é o número células inicialmente semeadas, e através do cálculo de tempo em cultura $PDt = t \cdot [\ln 2 / \ln(N_H/N_I)]$, onde t é o tempo em horas. A atividade associada à β -galactosidase foi analisada através do kit de coloração Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, Danvers, MA) seguindo as instruções do manual (Dimri et al. 1995). Alternativamente, também foi feita a análise da p16 intracelular (ver item 3.18).

3.11. Separação do PBMC de câmara de leucorredução

PBMC (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foram isoladas a partir de câmaras de leucorredução de sangue de doadores voluntários saudáveis. As amostras foram diluídas 1:5 em PBS e separadas por gradiente de Ficoll. Após a centrifugação a 970g por 30 minutos, as células mononucleares foram coletadas e lavadas com 50 mL de PBS. Após a lavagem, as células foram congeladas (método descrito anteriormente) na concentração de 1×10^7 células/mL. O perfil de células do sistema imune foi avaliado em todos os PBMC utilizados nos experimentos, por citometria de fluxo.

	% Linfócitos T (CD3+)	% Linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+)	% Linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)	% Linfócitos NKT (CD3+ CD56+)	% Linfócitos T auxiliares ativados (CD3+CD4+CD69+)	% Linfócitos T citotóxicos ativados (CD3+CD8+CD69+)	% Linfócitos B (CD19+)	% Monócitos (CD14+)	% Células NK (CD3- CD56+)
PBMC 1	43,83	27,53	12,26	2,40	3,2	2,31	9,25	20,80	18,91
PBMC 2	45,80	28,55	14,93	7,02	8,05	7,7	6,12	35,44	6,68
PBMC 3	35,25	20,80	10,13	4,27	5,89	3,22	6,18	42,52	6,17
PBMC 4	41,06	17,91	18,28	2,51	6,63	11,32	2,83	39,70	8,37

Tabela 2. Perfil de células do sistema imune nas amostras de PBMC que foram utilizadas no ensaio funcional. Foram utilizados 7 anticorpos (BD) e controle isotópico e controle negativo com as células não marcadas.

3.12. Ensaio funcional de cocultura de GW-CTM e PMBC alogênicas, com contato (one-way MLR)

Na cocultura one-way MLR utilizamos uma população de células respondedoras e uma população de células estimuladoras, linfócitos T e GW-CTM, respectivamente. As GW-CTM foram semeadas (3×10^4 células/poço) em

placas de 48 poços utilizando meio DMEM suplementado com 10% de SBF, 24 horas antes das PBMC, para que aderissem à placa. Após esse período, PBMC (3×10^5 células/poço) foram adicionadas à cultura na proporção de 1:10 (CTM:PBMC), com ou sem o estímulo de fitohemaglutinina (PHA, La Roche, Basel, SWI) e foram mantidos em cultura por 72 horas. A PHA é um mitógeno, uma substância que estimula a proliferação celular. São normalmente de natureza proteica, especialmente os da família das lectinas, que induzem mitose em linfócitos ao ligar-se as suas glicoproteínas de membrana. Após 3 dias, PBMC, que estavam em suspensão, foram coletadas para avaliar a proliferação dos linfócitos por citometria de fluxo, as GW-CTM aderidas à placa de cultura foram coletadas para extração de RNA, e posterior análise de moléculas reguladoras por PCR em tempo real, e o sobrenadante foi coletado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise por CBA. Escolhemos a proporção de 1:10 (CTM:PBMC) por estar bem estabelecida na literatura como melhor dose-resposta na supressão de linfócitos T (LT) (Zhou et al. 2011).

Utilizamos as seguintes condições experimentais em triplicata:

- GW-CTM
- GW-CTM + PHA
- GW-CTM + PBMC + PHA (1:10)
- PBMC
- PBMC + PHA

Figura 2. Esquema do ensaio funcional de cocultura de GW-TM com PBMC estimulado com PHA.

3.13. Ensaio funcional de cocultura de GW-CTM e PMBC alogênicas, com contato (one-way MLR) na presença de tratamento com IFN- γ

Usando o delineamento experimental semelhante ao descrito no item anterior, as GW-CTM foram semeadas (3×10^4 células/poço) em placas de 48 poços utilizando meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Após esse período, as GW-CTM foram tratadas por 24 horas com 50ng/mL de IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, USA). Após o tratamento, o meio foi retirado e PBMC (3×10^5 células/poço) foram adicionadas à cultura na proporção de 1:10 (CTM:PBMC) com ou sem o estímulo de PHA e foram mantidos em cultura por 72 horas. Após 3 dias, PBMC que estavam em suspensão foram coletadas para avaliar a proliferação dos linfócitos por citometria de fluxo, as GW-CTM aderidas a placa de cultura foram coletadas para extração de RNA e posterior análise de moléculas reguladoras por PCR em tempo real, e o sobrenadante foi coletado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise por CBA.

Utilizamos as seguintes condições experimentais em triplicata:

- GW-CTM
- GW-CTM + IFN- γ
- GW-CTM + PBMC + PHA (1:10)
- GW-CTM + IFN- γ + PBMC + PHA (1:10)
- PBMC
- PBMC + PHA

3.14. Ensaio de proliferação celular de PBMC

Para os ensaios funcionais de proliferação de linfócitos induzida por PHA e avaliação do potencial supressor das GW-CTM, as células foram marcadas com Click-iT® EdU Pacific Blue™ Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), um marcador que utiliza um análogo de timidina (EdU) modificado que é incorporado no DNA de células em proliferação. A marcação foi realizada seguindo as instruções do manual. Adicionalmente, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45 (molécula expressa em todos os leucócitos), anti-CD3 (marcador específico para linfócitos T), anti-CD4 e anti-CD8 (marcadores de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) e *Live/Dead Cell Viability Assay* (marcador utilizado para excluir células mortas da análise – Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) para avaliar o efeito da GW-CTM em cada uma das subpopulações de linfócitos.

Figura 3. Estratégia de análise de proliferação de células T. Foram adquiridos 30.000 eventos na região de LT determinada por SSC x FSC. Para análise delimitamos a região das células vivas utilizando o marcador Live/Dead, dentro desta a região das células CD45⁺, a seguir os LT, dentro desta região selecionamos as células CD3⁺, e em seguida as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺. Posteriormente, utilizando a amostra sem estímulo marcada com Click It, selecionamos a região onde estariam as células Click It⁺. Em cada uma das populações analisamos a porcentagem de positividade do marcador Click It.

3.15. Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total das GW-CTM foi extraído usando RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, GER) seguindo as instruções do fabricante. A pureza das amostras foi determinada pela razão entre os valores de absorbâncias em 260 nm e 280 nm.

Somente as amostras que apresentaram razões entre 1,7 e 2,0 foram utilizadas. A integridade do material foi averiguada através da eletroforese em agarose a 1,5% e coloração com brometo de etídio. O cDNA foi preparado a partir de 500 ng de RNA total com o uso de 200 U da enzima transcriptase reversa SuperScript III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) combinada com 50 µg de Oligo-dT, 10 mM de dNTP em tampão concentrado específico e água, volume final de 20 µL. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, DE) sob as condições de 5 min a 25°C, 50 minutos a 50°C e 15 min a 70°C.

3.16. PCR em tempo real (qPCR)

Para a quantificação do produto formado durante a reação de qPCR, foi utilizado o reagente TaqMan Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). O qPCR foi realizado no 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e a análise dos dados gerados durante a amplificação foi realizada usando o programa computacional 7500 Software v2.0.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata. Como matriz, foram utilizados 1,2 µL do cDNA sintetizado, 0,3 µL de sonda específicos para cada gene na concentração final de 400nM cada, 6 µL do reagente Taq Man Master Mix e 4,5 µL de água DEPC (Ambion, Austin, TX), num volume final de 12 µL. As reações foram efetuadas nas seguintes condições: 50° C por 2 minutos, 40 ciclos com as seguintes etapas:

desnaturação do DNA a 95°C por 15 segundos, anelamento dos “primers” (temperatura determinada pelo par de “primers” utilizado na reação) por 1 minuto. A normalização foi realizada através da expressão de genes constitutivos (*housekeeping*), sendo que a expressão do gene alvo foi determinada em relação à expressão do gene controle. Para tanto, utilizamos o gene GAPDH. A análise dos resultados da PCR em tempo real foi semiquantitativa, segundo o modelo matemático do método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen 2001). **Seleção de Primers:** Os *primers* foram selecionados através do banco de dados de sondas TaqMan da empresa Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.

Gene	N° catálogo
GAPDH	Hs02758991
IL-1 α	Hs00174092
IL-1 β	Hs01555410
IL-6	Hs00985639
IL-8	Hs00174103
IL-10	Hs00961622
IL-11	Hs01055413
IDO	Hs00984148
HGF	Hs00300159
TGF- β 1	Hs00998133
LIF	Hs01055668

Tabela 3. Sondas TaqMan utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real.

3.17. Extração de proteínas

Ao final do procedimento experimental, as placas foram lavadas com PBS gelado, aspiradas completamente e congeladas por imersão em nitrogênio

líquido. Sobre a placa foi adicionado 250 µL de tampão de lise celular - RIPA (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) com 1% de coquetel de inibidores de proteases e fosfatases; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). A seguir, foram homogenizadas com seringas e agulha 21G. Após centrifugação a 12.000 rpm / 4°C por 10 min, o sobrenadante, contendo as proteínas totais das células, foi separado e quantificado pelo kit BCA Protein (Bio-Rad, Hercules, CA). Albumina bovina foi utilizada para a diluição da curva-padrão.

3.18. Western Blot

A mesma quantidade de proteína (10 µg) foi aplicada em cada poço do gel contendo SDS-poliacrilamida em tampão Tris-glicina (15%). A primeira etapa da corrida ocorreu a 100V constantes até que as amostras atingissem o grau de separação desejado. As proteínas do gel foram eletroforéticamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão gelado de Tris-Glicina contendo 20% de metanol sob agitação contínua durante 80 minutos a 275 mA constantes. A membrana foi incubada em solução de bloqueio (tampão TBS contendo 0,05% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado) por 40 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo primário: anti-p16 (1:1000, #1473; Abcam, Cambridge, UK) diluído na solução em leite ou BSA (seguindo as instruções do fabricante) por uma noite a 4°C. Após 4 lavagens com TBST (tampão de solução salina com Tris e Tween 20), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP

anti-coelho (1:2000; #7074s; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), diluídos em 1% de leite durante 1 hora. Após 4 lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com solução de revelação ECL Plus (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) por 5 min e expostas em filmes de raio-X (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) por variados períodos até que as bandas fossem detectadas após a revelação.

Para controle da quantidade de proteína utilizada nas amostras, as membranas foram submetidas ao procedimento de remoção dos anticorpos ligados usando uma solução de SDS, β -mercaptoetanol e Tris-HCl 1M (pH 6,7) por 30 minutos a 50°C com agitação ocasional. A seguir, após 2 lavagens com TBST, o protocolo de incubação foi repetido, agora com anticorpo primário anti- β -actina (1:10.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

3.19. Análise da secreção de citocinas

Para a determinação das citocinas produzidas pelas GW-CTM, utilizamos a técnica "Cytometric Bead Assay (CBA) Flex" (BD Biosciences, San Jose, USA) que permite a detecção de múltiplas citocinas simultaneamente em uma mesma amostra. Os sobrenadantes das culturas de GW-CTM e coculturas foram coletados e as dosagens das citocinas IL-1 α , IL1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11 e TGF- β 1 foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 50 μ L de sobrenadante foi distribuído em placas de 96 poços (filterplates) na presença das microesferas de captura para as diferentes citocinas, seguido de

incubação durante 180 min, sob agitação constante. Após este período, as amostras foram lavadas por filtração em bomba à vácuo e, em seguida, foi adicionada uma solução com os anticorpos de detecção conjugados a Ficoeritrina (PE). Após nova lavagem, a leitura das amostras foi feita em um citômetro de fluxo (BD-LSR Fortessa).

3.20. Tratamento com IL-11 recombinante

GW-CTM foram semeadas (5×10^5 células por poço) em placas de 6 poços, após 24h as células foram incubadas com IL-11 recombinante (PeproTech, Rocky Hill, USA), por 24h, utilizando 3 doses diferentes (1, 10 e 100ng/mL). Após esse período, as células foram lisadas para análise de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, TGF- β 1, LIF e HGF por PCR em tempo real.

Além das CTM, avaliamos o efeito do tratamento com IL-11 na proliferação de PBMC sob estímulo de PHA. Para os experimentos seguintes utilizamos doses menores de IL-11 em relação ao experimento anterior, por serem doses mais próximas às quantidades produzidas por nossas amostras de GW-CTM. As células foram plaqueadas (3×10^5 células por poço) em placa de 48 poços, na ausência ou presença de PHA e IL-11 recombinante em 3 concentrações diferentes (0,5 ng/mL, 5ng/mL e 50ng/mL). Após 72 horas, as células foram coletadas e marcadas com os anticorpos descritos no item 4.14.

Para análise da proliferação celular do PBMC, a leitura das amostras foi feita em citômetro de fluxo (BD-LSR Fortessa).

3.21. Análise estatística

Análises estatísticas dos dados deste estudo foram feitas pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001) por modelo de regressão linear. As análises das variáveis-resposta relacionadas à expressão gênica em células mesenquimais, à proliferação de células do sistema imune e secreção de moléculas imunomoduladoras após cocultura foram feitas considerando-se, como variáveis explicativas, cada cultura primária e as condições empregadas (PBMC, PBMC + PHA, CTM, CTM^{IFN- γ} , CTM + PBMC + PHA, CTM^{IFN- γ} + PBMC + PHA). Para análise basal das citocinas IL-6, IL-8 e IL-11 secretadas no meio de cultura, levou-se em consideração cada cultura primária e as passagens das células. Após se observar a distribuição dos dados, quando não se atingiu os critérios de distribuição normal, transformações logarítmicas foram empregadas. Os testes de Tukey-Kramer foram utilizados para ajuste de comparações múltiplas. Em todos os testes a significância estabelecida foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Definição de protocolo para obtenção de GW-CTM

Para estabelecer um controle de qualidade e melhorar a obtenção de CTM, quatro protocolos de isolamento de GW-CTM, já descritos na literatura e amplamente utilizados, foram testados em oito cordões umbilicais (amostras chamadas de Parede de Cordão Umbilical – PCU). Em três destes protocolos as células foram isoladas a partir de um processo de digestão enzimática com collagenase tipo 1. No quarto protocolo foi utilizado o método de explante. Dependendo do tamanho e da qualidade de cada cordão, foi possível utilizar mais de um protocolo de isolamento na mesma amostra (tabela 4). Todas as amostras foram comparadas em termos de duplicação da população (DP), o tempo de parada de proliferação, diferenciação celular e morfologia. Após a obtenção das células, a caracterização morfológica e fenotípica e a análise de diferenciação e proliferação, selecionamos o protocolo de isolamento que consideramos mais eficaz para obtenção das células, o protocolo 2. Esses dados foram publicados em um artigo na revista *Cell and Tissue Banking* em 2015 (Paladino et al. 2015).

	Protocolo 1	Protocolo 1 modificado	Protocolo 2 (Colagenase)	Protocolo 3 (Explante)
PCU78	X			
PCU79	X			
PCU80	X		✓	✓
PCU81		✓		✓
PCU82		✓	✓	
PCU83			X	✓
PCU84			✓	✓
PCU85			✓	✓

Tabela 4. Amostras coletadas e protocolos de isolamento testados. Protocolos marcados com X foram testados, mas não obtivemos células. Os protocolos com ✓ foram testados com sucesso na obtenção das células.

4.2. Células isoladas de cordão umbilical apresentaram características morfológicas e moleculares típicas de CTM

4.2.1. Morfologia de GW-CTM

Analizamos a morfologia de amostras isoladas a partir de cordão umbilical humano proveniente de 8 doadoras. Características morfológicas foram registradas durante as primeiras três passagens (P0, P1 e P2), onde observamos maior heterogeneidade nas placas de cultura celular. Nessas passagens, foram observadas algumas células menores com morfologia poligonal, formando pequenas colônias. Essas características morfológicas e também o potencial clonogênico são propriedades de células progenitoras endoteliais (figura 4). No entanto, independentemente do protocolo utilizado, depois da segunda passagem, as células endoteliais e a maioria das células não

aderentes foram eliminadas e as CTM foram selecionadas. As células eram predominantemente semelhantes a fibroblastos, com formato alongado, uma morfologia típica de CTM (figura 5).

Figura 4. Morfologia celular heterogênea das GW-CTM em passagens precoces (P0 - P2). (a) GW-CTM obtidas utilizando o protocolo 1, 24 horas após o isolamento (b) GW-CTM obtidas utilizando o protocolo 2, 24 horas após o isolamento (c) GW-CTM obtidas utilizando o protocolo 3, 7 dias após o isolamento. Aumento de 20X e 40X. Todas as CTM demonstraram morfologia fusiforme após a P2.

Figura 5. Células-tronco mesenquimais de geleia de Wharton. Células isoladas a partir do protocolo 3, na passagem 5. Aumento de 20x. Figura representativa de 8 experimentos.

4.2.2. Caracterização das CTM por citometria de fluxo

Todas as CTM obtidas apresentaram, na sua superfície, um perfil de expressão molecular positivo para: CD29, CD73, CD44, CD90 e CD166 e negativo para marcadores hematopoiéticos como CD34 e CD45, marcadores de monócitos CD14, de células endoteliais CD31 e CD106, de precursores hematopoiéticos CD133, de progenitores hematopoiéticos CD117 e antígeno leucocitário humano HLA-DR, conforme os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (figuras 6, 7 e 8). Observamos que algumas amostras apresentaram um pequeno aumento (4,9 - 14,2%) na porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-CD106. Esse perfil já foi identificado por Yang e colaboradores que mostraram que subpopulações de CTM, que expressavam CD106 em sua superfície, apresentavam melhor capacidade supressora em relação à CTM com expressão negativa de CD106 (Yang et al. 2013).

Figura 6. Fenotipagem de GW-CTM. As células foram coletadas e marcadas com um painel de anticorpos e marcadores de superfície foram detectados por citometria de fluxo. Células em P5 isoladas a partir do PCU80. Figura representativa de 8 amostras.

Marcadores de superfície	PCU79 - Prot 1	PCU80 - Prot 2	PCU80 - Prot 3	PCU81 - Prot 1	PCU81 - Prot 3	PCU82 - Prot 1	PCU82 - Prot 2	PCU83 - Prot 3	PCU84 - Prot 2
CD14	1,0	0,4	0,4	1,0	1,2	0,3	1,0	0,9	2,33
CD106	1,5	13,7	1,4	1,3	14,0	1,6	1,6	4,9	14,2
CD34	2,6	0,1	0,2	1,5	1,1	2,3	1,6	1,7	1,94
CD31	2,8	0,1	0,2	1,2	0,7	2,0	1,4	1,6	1,96
CD45	1,2	0,2	0,6	0,3	0,8	0,0	0,1	1,0	3,58
CD133	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,2	0,2	0,1	0,21
HLA-DR	3,6	3,5	1,5	2,3	3,8	0,1	0,6	1,2	4,12
CD117	1,3	4,6	0,9	2,9	1,4	0,5	0,2	2,3	2,04
CD44	100,0	100,0	99,6	99,9	99,5	99,8	99,9	97,4	99,9
CD90	99,9	100,0	99,8	98,9	99,6	100,0	100,0	98,5	100
CD166	94,3	98,1	100,0	98,3	99,7	100,0	98,5	92,1	100
CD73	99,9	99,1	99,9	99,7	99,7	100,0	99,8	95,4	100
CD29	99,8	99,9	99,4	100,0	99,6	99,9	100,0	99,9	99,9

Figura 7. Porcentagem de positividade dos marcadores de superfície. Os números equivalem às porcentagens de positividade obtidas para cada um dos marcadores. (n=6)

Figura 8. Imunofenotipagem das GW-CTM - porcentagem de positividade dos marcadores de superfície. Células de 8 cordões foram coletadas e marcadas com um painel de anticorpos e marcadores de superfície foram detectados por citometria de fluxo. Cada ponto representada uma amostra testada. (n=6)

4.3. CTM têm capacidade de se diferenciar em adipócito e osteócito

As células foram cultivadas durante 21 dias com meios específicos para diferenciação em adipócito e osteócito. Após esse período, as células foram coradas com Oil Red para identificação das gotículas de lipídeos no citoplasma, e Alizarin Red para coloração de depósitos de cálcio. Todas as amostras foram capazes de se diferenciar nas 2 linhagens, conforme exemplificado na figura 9.

Em paralelo fizemos a diferenciação de MO-CTM, células utilizadas como padrão para comparação dos resultados obtidos com as GW-CTM. Observamos que o padrão de diferenciação em adipócitos das duas fontes utilizadas é bastante diferente.

O que chama atenção é o fato de que a diferenciação ocorre em um número de células menor em MO-CTM (figura 9 h e i) quando comparada com as GW-CTM (figura 9 b,c), porém com uma quantidade maior de vesículas de gordura no citoplasma dessas células. Essa observação nos levou a pensar que as MO-CTM e de GW apresentam, de fato, diferenças funcionais, podendo apresentar perfis de produção de citocinas e capacidade imunomoduladoras diferentes.

Figura 9. Diferenciação de CTM em adipócito e osteócito. As células foram cultivadas por 21 dias com meios de diferenciação para as duas linhagens. Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído e coradas com Oil Red e Alizarin Red. CTM coradas com Oil Red (a) CTM de GW não diferenciadas, (b,c) CTM de geleia de Wharton diferenciadas em adipócito – aumento de 20x e 40x, respectivamente. CTM coradas com Alizarin Red (d) células não diferenciadas, (e,f) células diferenciadas em osteócito – aumento de 20x e 40x respectivamente. CTM coradas com Oil Red (g) MO-CTM não diferenciadas, (h,i) MO-CTM diferenciadas em adipócito – aumento de 20x e 40x respectivamente. Experimento realizado em triplicata (n=8).

4.4. GW-CTM apresentaram capacidade proliferativa diferente entre amostras e protocolos

Para avaliar a capacidade de proliferação das CTM, foram semeadas 4.000 células/cm², cultivadas a partir da mesma densidade em todas as passagens até atingirem 70% de confluência. As células foram mantidas em cultura até atingirem a senescência. Após esse período, foi realizado o cálculo de tempo de duplicação da população e duplicação da população acumulada para cada uma das amostras. Duplicação da população (DP) acumulada é a medida da capacidade de expansão clonal de um grupo de células, representado pelo número total de vezes que as células duplicaram. Observamos que apesar de utilizarmos o mesmo protocolo de isolamento, mesmas condições de cultivo e das CTM serem obtidas do mesmo tecido (GW), cada cordão se comporta de uma maneira diferente em relação ao número de passagens até atingirem a senescência, tempo em cultura e DP por passagem. Devido à dificuldade em se obter CTM a partir do protocolo 1 e o protocolo 2 apresentar melhores taxas de proliferação e atingir passagens mais tardias em relação ao protocolo 3, optamos por utilizar como protocolo padrão de isolamento de CTM, o protocolo 2.

Mesmo assim, o comportamento de cada uma das linhagens estudadas foi bastante diversificado. Quando comparamos amostras diferentes obtidas a partir do mesmo protocolo (protocolo 2), PCU80 e PCU82 atingiram as passagens 21 e 25 respectivamente, enquanto o cordão PCU84 entrou em senescência na passagem 16 (figura 10). Por outro lado, apesar de atingir a senescência em uma passagem anterior dos demais cordões, a PCU84

apresentou tempos de DP mais lentos quando comparado com as PCU80 e PCU82, mostrando também que as células crescem em velocidades diferentes (figura 11).

Observamos que células obtidas do mesmo cordão se comportaram de maneira semelhante, ainda que isoladas com protocolos diferentes. Por exemplo, células da PCU80 isoladas utilizando o protocolo 2 duplicaram 43 vezes e foram mantidas em cultura até 88 dias, quando atingiram a senescência. Da mesma forma, a mesma amostra obtida a partir do protocolo 3 duplicou 33 vezes e foi mantida em cultura por 93 dias (figura 11).

No entanto, na mesma situação, em outro cordão pudemos observar comportamento diferente, como por exemplo, a PCU84. As células derivadas do protocolo 2 duplicaram 40 vezes e permaneceram 100 dias em cultura, porém as células obtidas a partir do protocolo 3 tiveram o DP acumulado bem menor (18 vezes) e foram mantidas em cultura por metade do tempo (49 dias) (figura 11). Acreditamos ser isto um reflexo da variabilidade intrínseca observada nas linhagens de células obtidas a partir de diferentes cordões, cada cordão apresentando um comportamento único. Em seguida, foi necessário avaliar a progressão da senescência nessas diferentes linhagens de células mesenquimais.

Figura 10. Duplicação da população de GW-CTM. As células foram cultivadas utilizando 4.000 células por cm^2 . Após atingirem a senescência, avaliamos a capacidade de proliferação das amostras, através de contagem de células plaqueadas inicialmente e após atingirem 70% de confluência. **(A)** Comparação entre PD por passagem e número de passagens. (n=6)

Figura 11. Tempo de duplicação da população de GW-CTM. As células foram cultivadas utilizando 4.000 células por cm^2 . Após atingirem a senescência, avaliamos a capacidade de proliferação das amostras, através de contagem de células plaqueadas inicialmente e após atingirem 70% de confluência. Comparação entre DP acumulada e dias em cultura. (n=6)

Os resultados mostrados a seguir, foram obtidos com células isoladas de 4 cordões de doadores diferentes (PCU80, PCU82, PCU83 e PCU84), isoladas a partir dos Protocolos 2 e 3.

4.5. GW-CTM atingem a senescência em passagens diferentes

Para avaliar a senescência replicativa nas CTM, as células foram cultivadas até a parada da proliferação e as amostras foram coletadas em 3

momentos diferentes, na passagem 5 (P5) considerada uma passagem inicial, na passagem 15 (P15), qualificada como uma passagem intermediária e na passagem na qual as células pararam de proliferar.

Utilizamos dois métodos para avaliar a senescência replicativa das CTM. Utilizamos um teste que detecta a presença da enzima β -galactosidase (β -gal), descrita em 1995 (Dimri et al. 1995). Espera-se que a sua presença na célula faça a distinção entre as células senescentes e as quiescentes ou em proliferação. Ao utilizarmos esse teste, observamos um aumento gradativo da marcação de β -gal no citoplasma das células, conforme o número de passagens (figura 12 A). Apesar da coloração de β -gal ser amplamente utilizada como um marcador de senescência, seu uso para investigação de envelhecimento celular tem gerado dúvidas sobre a sua especificidade (Severino et al. 2000; Sosińska et al. 2014), pois há diversas situações em que também pode ocorrer o acúmulo da enzima nos compartimentos intracelulares.

Por este motivo, utilizamos um método complementar para detecção de células senescentes. Através de Western blot, analisamos a expressão da proteína p16, que tem um papel importante na regulação do ciclo celular. As células senescentes são caracterizadas por uma parada de crescimento irreversível em G1, que envolve a diminuição da expressão de genes que conduzem à progressão do ciclo celular e à regulação positiva de inibidores do ciclo celular, como p53/p21 e p16 (Sethe et al. 2006). Observamos um aumento gradativo da expressão da proteína p16 conforme o aumento do número de passagens das células (figura 12 B). Porém, apenas na PCU84, ocorreu um aumento da proteína p16 na passagem 15 e depois uma diminuição na passagem 16 (figura 12 B) apesar da marcação de β -gal aumentar conforme as

passagens (figura 12 A). Este evento coincidiu com o observado nas células em cultura, pois em P15 as CTM da PCU84 já apresentavam características de células senescentes, com a presença de células maiores, com morfologia heterogênea e proliferação lenta, mas em P16 pareciam ter revertido esse perfil. A PCU83 também apresentou um perfil diferente na expressão de p16 e foi possível observar sua expressão já na P5. Acreditamos que a expressão de p16 na passagem precoce pode ser a causa das células terem parado de proliferar já na P15. Assim, as células desse cordão ficaram senescentes mais rapidamente quando comparadas com as outras amostras.

Figura 12. Senescência replicativa em GW-CTM. As células foram cultivadas utilizando 4.000 células por cm^2 . Foram coletadas amostras em 3 momentos diferentes para avaliarmos a expressão de p16 e a marcação da β -galactosidase. **(A)** Células viáveis marcadas em roxo com cristal violeta e células senescentes marcadas em azul com o teste de β -galactosidase. **(B)** Expressão de p16 normalizada pelo controle endógeno β -actina. Experimentos realizados em triplicata. (n=5)

4.6. Expressão gênica de p53, isoformas de p53 e componentes da via em GW-CTM após indução de senescência replicativa

Ainda na busca de tentar esclarecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de senescência das GW-CTM, buscamos investigar as funções da via de sinalização de p53 em paralelo com o potencial de proliferação. O importante impacto da p53 no controle do ciclo celular, apoptose, estabilidade genômica e desenvolvimento tumoral evidencia a importância de estudar a p53 no contexto da biologia de GW-CTM.

Recentemente as GW-CTM têm sido objeto de estudo devido à variedade de aplicações terapêuticas potenciais, no entanto, nessas células tão jovens, o processo de regulação da capacidade proliferativa até atingir a senescência ainda é pouco conhecido.

Com o propósito de avaliar se a p53 afeta o potencial proliferativo de GW-CTM durante a expansão *in vitro* até ser atingida a senescência replicativa, foi feita a análise da expressão dos genes envolvidos nas vias associadas à p53 em GW-CTM. Foram coletadas amostras de GW-CTM em passagem inicial, intermediária e final. Avaliamos a expressão de genes envolvidos na via de sinalização da TP53 (p53, MDM2, CDKN1A - p21), duas isoformas de TP53 ($\Delta 133p53$ e $p53\beta$), e p16 (CDKN2A) um marcador conhecido de células senescentes. Foi possível detectar a expressão gênica de TP53 e MDM2 em níveis diferentes dependendo da idade das células (figura 13). Além disso, avaliamos a expressão das duas isoformas de p53, $\Delta 133p53$ e $p53\beta$, que são, respectivamente, reguladores fisiológicos da proliferação celular e da senescência (Fujita et al. 2009; Mondal et al. 2011)

Em nossos experimentos, observamos que a expressão de p53 é variável entre as amostras, mas a isoforma $\Delta 133p53$ apresenta-se menos expressa em células senescentes, enquanto a isoforma $p53\beta$ encontra-se aumentada nesse mesmo estágio, corroborando dados da literatura em outros tipos celulares. A isoforma $p53\beta$ pode ser utilizada como marcador adicional para detecção de GW-CTM senescentes. Os genes p21 e p16 envolvidos na regulação do ciclo celular exibem o mesmo perfil de expressão, encontram-se aumentados quando as GW-CTM atingem a senescência replicativa. Como não foi possível observar um padrão de expressão nas amostras, para estabelecer uma relação entre a maior ou menor

expressão de p53 e/ou de suas isoformas com a capacidade de proliferação em cultura, outros experimentos seriam necessários.

Figura 13. Expressão de genes associados à via da p53 em GW-CTM. As células foram cultivadas utilizando 4.000 células por cm^2 e foram coletadas amostras em três passagens diferentes. As células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de p53, $\Delta 133\text{p53}$, p53 β , MDM2, p21 e p16. **(A)** PCU80 **(B)** PCU82, **(C)** PCU83 e **(D)** PCU84. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e valores expressos como número de vezes em relação ao controle - células em P5 (fold-change). Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ EPM. (n=4)

4.7.A expressão dos genes de moléculas imunomoduladoras é variável nas GW-CTM

Além de avaliar proliferação, diferenciação e senescência nas CTM, analisamos também o perfil basal de expressão gênica de moléculas

imunomoduladoras. Conforme descrito na literatura, escolhemos algumas moléculas solúveis envolvidas no processo de imunossupressão das células do sistema imune pelas CTM. Os resultados mostram que as amostras expressam quantidades diferentes de cada gene, mas alguns deles se comportam da mesma maneira em cordões diferentes. Nas amostras PCU80, 82 e 83 (figuras 14 A, B, C e D), a expressão de *IL-1 α* não mudou conforme as CTM progrediram em seu nível de senescência, enquanto que, na PCU84 (figura 14 E), ocorreu um aumento da expressão desse gene nas passagens tardias. Nas células das PCU80 e 84, a expressão de *IL-1 β* aumentou na P15 em relação a P5 e depois diminuiu quando as células atingiram a senescência. Em contraste, nas PCU82 e 83 não houve variação na expressão desse gene.

Medimos também a expressão de *IL-6* e *IL-8*, que além de serem citocinas pró-inflamatórias, fazem parte do perfil SASP (do inglês senescence-associated secretory phenotype), descritas na literatura como marcadoras de senescência (Coppé et al. 2010). Nos cordões 80 e 84 (figuras 14 A e E), a expressão gênica de *IL-6* aumentou 6 e 11 vezes na P15, respectivamente, em relação às células na P5. Essa expressão, porém, diminuiu novamente na passagem em que as células se tornaram senescentes. Já na PCU83, houve diminuição na expressão de *IL-6* na P15 em relação a P5 (figura 14 D). Na PCU82 não houve alteração na expressão de *IL-6* conforme as passagens (figura 14 C). A expressão de *IL-8* aumentou na P15 em todas as amostras, exceto na PCU80 isolada a partir do protocolo 2. Na passagem onde as células pararam de proliferar, a expressão foi variável entre as amostras.

Houve uma diminuição uniforme da expressão de *IL-11* nas passagens tardias. A expressão de *TGF- β 1* não mudou independentemente da passagem

analisada. Finalmente, a expressão de *IDO* e *HGF* foi muito variável entre as amostras, até mesmo, em alguns casos, não havendo a expressão nenhuma desses genes na amostra.

Apesar da expressão dos genes analisados variar, pudemos observar que a PCU80 teve um aumento tanto em moléculas pró-inflamatórias quanto nas imunossupressoras; já a PCU82 teve um aumento maior na expressão gênica dessas moléculas (figura 14 C). Por outro lado, as PCU83 e PCU84 tiveram aumento na expressão dos genes relacionados com atividade pró-inflamatória (figuras 14 D e E).

Esse resultado nos mostra que a mesma variabilidade observada nos experimentos descritos anteriormente também ocorre no perfil basal da expressão gênica de moléculas envolvidas no processo de supressão das CTM. A confirmação da produção celular dessas moléculas, portanto, fez-se necessária para confirmar os achados.

Figura 14. Expressão gênica basal de moléculas imunomoduladoras em GW-CTM. As células foram cultivadas utilizando 4.000 células por cm^2 e foram coletadas amostras em 3 passagens diferentes. As células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, HGF, TGF- β 1, IDO e LIF. **(A)** PCU80 - Protocolo 2, **(B)** PCU80 - protocolo 3, **(C)** PCU82 – Protocolo 2, **(D)** PCU83 – Protocolo 3 e **(E)** PCU84 – Protocolo 2. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle - células em P5 (fold-change). Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ EPM. (n=4)

4.8. Secreção basal de moléculas imunomoduladoras é variável nas amostras de GW-CTM

Além de avaliar a expressão gênica das moléculas imunossupressoras, dosamos a secreção dessas moléculas no sobrenadante das GW-CTM no mesmo momento em que as células foram coletadas para fazer extração de RNA para o PCR em Tempo Real. Foram dosadas as citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11. Mesmo nas amostras com RNAm presente, não foi possível detectar a presença de IL-1 α , IL-1 β e IL-10 em nenhuma das amostras.

A citocina IL-11 foi secretada pelas GW-CTM de acordo como observado na expressão gênica nas PCU80, 82 e 83, onde observamos uma diminuição

significativa na secreção de IL-11 com o aumento do número de passagens (figura 15). Porém na PCU84, houve um inesperado aumento significativo da secreção de IL-11 na P16 (tabela 5).

Avaliamos também a secreção dos marcadores de senescência IL-6 e IL-8, que conforme as células ficam senescentes, se espera que mostrem aumento da sua secreção. Porém, pudemos observar uma diminuição da secreção de ambas, mais acentuada da IL-6 que a da IL-8, nas passagens de parada de proliferação das PCU80, PCU82 e PCU83 (figura 15). Curiosamente na PCU84, a secreção dessas citocinas aumentou significativamente na passagem mais tardia. Isso pode ser reflexo do fato já comentado acima de que esse cordão apresentou características de senescência na P15 e na P16 parecia não se comportar mais como uma célula senescente em relação à morfologia e proliferação. Em suma, nossos resultados são discrepantes em relação aos descritos na literatura, exceto para a PCU84, pois não observamos aumento da secreção de IL-6 e IL-8 nas GW-CTM em progressão para senescência. Essas medidas foram feitas a partir de células mesenquimais em cultura, mas sem serem ativadas. Nos experimentos seguintes buscamos analisar a capacidade imunomoduladora dessas células em cocultura com PBMC.

Figura 15. Secreção de IL-6, IL-8 e IL-11 em GW-CTM. As células foram semeadas na densidade de 4.000 células por cm^2 e após atingir a confluência de 70-80% o sobrenadante foi coletado, estas amostras foram coletadas em 3 passagens diferentes. A dosagem de IL-6, IL-8 IL-11 foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o sistema CBA Flex. **(A)** PCU80 - Protocolo 2, **(B)** PCU80 - protocolo 3, **(C)** PCU82, **(D)** PCU83 e **(E)** PCU84. Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. (n=4)

Medida	Comparação	CTM1	CTM2	CTM3	CTM4	CTM5
IL6	<i>Inicial - Intermediária</i>	<0,001	<0,001	0,593	<0,001	<0,001
	<i>Intermediária - Final</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,220	0,003
	<i>Inicial - Final</i>	<0,001	0,016	<0,001	<0,001	<0,001
IL8	<i>Inicial - Intermediária</i>	<0,001	<0,001	0,001	0,845	0,150
	<i>Intermediária - Final</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
	<i>Inicial - Final</i>	0,005	0,026	<0,001	<0,001	<0,001
IL11	<i>Inicial - Intermediária</i>	0,001	0,157	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>Intermediária - Final</i>	0,003	<0,001	<0,001	>0,999	<0,001
	<i>Inicial - Final</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,515

Tabela 5. Valores de P das comparações múltiplas entre passagens, por indivíduo da secreção de IL-6, IL-8 e IL-11 em GW-CTM. (CTM1) PCU80 – Prot2, (CTM2) PCU80 – Prot3, (CTM3) PCU82, (CTM4) PCU83 e (CTM5) PCU84.

4.9. Ensaio funcional em cocultura de GW-CTM e PBMC

Parte dos dados de ensaio funcional foram aceitos para publicação na revista Stem Cell International (artigo anexado ao final da tese).

4.9.1. GW-CTM suprimem a proliferação de LT CD3⁺ estimuladas com PHA em graus diferentes

Para avaliarmos o potencial imunossupressor das GW-CTM, realizamos um experimento funcional bem estabelecido na literatura, onde primeiramente as GW-CTM em passagem 5 (P5) foram semeadas e 24 horas foram

necessárias para que as células aderissem ao plástico. Após esse período, o PBMC foi descongelado e colocado em cultura juntamente com as GW-CTM em DMEM suplementado na presença de PHA por 72 horas. PBMC na presença ou ausência de PHA foram adicionados como controle. A PHA é um mitógeno utilizado como um estímulo inespecífico, que desencadeia a ativação dos linfócitos, isto é, induz a divisão celular. Optamos por utilizar a proporção de 1:10 GW-CTM:PBMC, por ser a capacidade máxima de células que nosso experimento permitia e por ser uma dose onde diversos trabalhos observaram haver efeito das CTM sobre a proliferação de linfócitos T (Krampera et al. 2003; Ramasamy et al. 2008; Yang et al. 2013). Após 72 horas, o PBMC foi recolhido da cultura e marcado com o sistema Click It Kit para medir a proliferação, além de anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. Esses experimentos foram realizados utilizando 3 amostras de GW-CTM (PCU80, PCU82 e PCU83) e todas elas foram desafiadas utilizando as mesmas 2 amostras de PBMC (PBMC1 e PBMC2). Esse desenho experimental buscou eliminar a variável da amostra respondedora, para evidenciar reais diferenças entre as amostras de GW-CTM.

Nossos dados corroboram dados da literatura que indicam que as CTM, que no nosso caso, são células da geléia de Wharton, são capazes de diminuir a proliferação dos LT CD3⁺ (linfócitos totais). Em nossos experimentos, o efeito ocorreu em ambos os PBMC quando submetidos ao estímulo com PHA. Em diferentes graus, todas as amostras GW-CTM demonstraram a capacidade de inibir a proliferação de LT CD3⁺ ativadas por mitógeno, mas cada um dos PBMC respondeu com um padrão diferente de inibição (figura 16). Nos experimentos, efetuados em triplicata, observamos uma porcentagem de inibição maior no PBMC2, quando comparado ao PBMC1 ($p < 0,0001$). Também foi possível

observar uma diferença significativa no efeito principal pois cada cordão exibiu uma capacidade diferente de estímulo quando se observa as diferentes células mesenquimais incubadas com o mesmo PBMC ($p < 0,0001$).

Figura 16. Inibição da proliferação de LT totais $CD3^+$ mediada por GW-CTM. PBMC foi estimulado com PHA durante 3 dias na presença de CTM; a proporção de células utilizada foi 1:10 (CTM:PBMC). As passagens das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 ou P6. A proliferação de LT foi medida utilizando o sistema Click It por citometria de fluxo. A porcentagem de inibição (Inib) foi calculada utilizando o percentual de proliferação de PBMC + PHA + CTM em relação ao PBMC+PHA. Experimentos realizados em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. Diferenças estatísticas significativas estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

4.9.2. As células T apresentam perfis diferentes de resposta de acordo com cada amostra de PBMC

O próximo passo foi avaliar o efeito das CTM nas subpopulações de LT, CD3⁺ CD4⁺ auxiliares e CD3⁺CD8⁺ citotóxicos. Pudemos observar que o perfil de resposta do PBMC2 se mantém tanto em CD3⁺ CD4⁺ quanto CD3⁺ CD8⁺, independentemente da amostra de GW-CTM utilizada, mesmo as porcentagens de proliferação e inibição sendo distintas entre os experimentos. As GW-CTM foram capazes de inibir a proliferação tanto de LT CD3⁺ CD4⁺ ($p < 0,0001$) quanto de CD3⁺ CD8⁺ ($p < 0,0001$) na cocultura com PBMC2, mesmo sob o estímulo de PHA.

Por outro lado, nos resultados obtidos com o PBMC1, observamos comportamentos diferentes entre os cordões. PCU80 e PCU82 não foram capazes de inibir a proliferação das duas subpopulações de células T. Já com a PCU83, observamos uma pequena inibição na proliferação tanto nas células CD3⁺ CD4⁺ quanto nas CD3⁺ CD8⁺, porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa (figura 17 A e B).

Os resultados indicam que não só cada amostra de GW-CTM tem um comportamento único, mas a responsividade de cada PBMC também varia, mesmo que coletado e processado da mesma forma.

Figura 17. Inibição da proliferação de LT CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD8⁺ mediada por GW-CTM. PBMC foi estimulado com PHA durante 3 dias na presença de CTM, a proporção de células

utilizada foi 1:10 (CTM:PBMC). As passagens das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 ou P6. A proliferação de LT foi medida utilizando o sistema Click It por citometria de fluxo. A porcentagem de inibição (Inib) foi calculada utilizando o percentual de proliferação de PBMC + PHA+CTM em relação ao PBMC+PHA. Experimentos realizados em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

4.9.3. A produção de moléculas imunomoduladoras por GW-CTM varia após cultivo com PBMC

Para investigar se a produção de moléculas envolvidas no efeito supressor das CTM é alterada quando as células são colocadas frente a células do sistema imune, utilizamos o mesmo experimento descrito no item anterior. Realizamos a coleta do PBMC para análise da proliferação por citometria de fluxo, extração do RNA total das GW-CTM para avaliar a expressão das moléculas imunossupressoras por PCR em Tempo Real e a coleta do sobrenadante para quantificação das citocinas por CBA. Após 72 horas em cocultura, o PBMC foi retirado da cultura e as GW-CTM foram coletadas para extração de RNA. O tratamento com PHA nas GW-CTM sem cocultura foi adicionado para analisarmos o efeito de PHA separadamente, na ausência de cocultura. A análise estatística mostrou que a expressão da maioria dos genes não foi alterada significativamente quando comparamos CTM sem estímulo e CTM + PHA, exceto para os genes *IL-1 α* , *IL-6* e *IL-8* ($p < 0,05$) na amostra de PCU82.

As diferenças na expressão dos genes *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* e *LIF* entre cordões (individuais) e entre cada CTM sozinha e CTM em cocultura foram

estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) (Figuras A, B, C, D e I). O padrão de expressão de cada citocina pro-inflamatória (*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-8*) era similar entre os cordões, embora cada cordão expressasse estes genes em graus diferentes. Observamos um aumento significativo ($p < 0,0001$) na expressão destes genes nas CTM em cultura com ambos PBMC, quando comparados com as CTM sozinhas e a PCU83 apresentou a maior expressão de todos os genes após cocultura, quando comparada com as PCU80 e PCU82 (figura 18 A, B, C e D).

A expressão das moléculas supressoras, *IL-10* e *IDO*, também mostraram um comportamento similar. Em condições basais não houve a expressão de *IL-10* e *IDO* (exceto na expressão de *IDO* da PCU80), porém quando colocadas em cultura com os PBMC, as 3 GW-CTM passaram a expressar ambos os genes (figura 18 E e G). Nos três casos, as células que foram colocadas em contato com o PBMC2 expressaram mais *IL-10* do que as células em cocultura com PBMC1, o que não aconteceu com *IDO*.

Por fim, observamos aumento de expressão de *IL-11* nas 3 amostras em cultura com PBMC2 (figura 18 F). A expressão dos genes *HGF* e *LIF* variaram entre as GW-CTM (figura J e I). Além disso, não houve diferença na expressão gênica de *TGF- β 1* (figura 18 H).

Nossos dados mostram que a variabilidade descrita nos parâmetros de proliferação e longevidade também é encontrada na expressão gênica de moléculas envolvidas na capacidade imunomoduladora das GW-CTM.

Figura 18. Expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em CTM cultivadas com PBMC estimulado com PHA. As células foram semeadas e após 24 horas o PBMC estimulado com PHA foi adicionado a cultura. As amostras foram coletadas após 72 horas. As células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de (A)IL-1 α , (B) IL-1 β , (C)IL-6, (D)IL-8, (E)IL-10, (F)IL-11, (G) IDO, (H) TGF- β 1, (I)LIF e (J)HGF. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle - células em P5 (fold-change). Exceto IL-10 e IDO onde a expressão foi normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao calibrador, pois as células controle (CTM) não apresentaram expressão desses genes. Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. As passagens das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 e P6. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

4.9.4. Secreção de moléculas imunomoduladores por GW-CTM quando cultivadas com PBMC estimulados com PHA

Para completar a análise do ensaio funcional em cocultura de GW-CTM com PBMC estimulado com PHA, foi feita a quantificação das moléculas imunossupressoras (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11 e TGF- β 1) secretadas no sobrenadante da cultura celular. Analisamos o sobrenadante de amostras de CTM sozinhas, CTM tratadas PHA e CTM cultivadas com PBMC.

Quando dosamos IL-1 α , IL-1 β , IL-10 e IL-11 secretadas, no sobrenadante, nós pudemos observar que, apesar de haver expressão desses genes no PCR em Tempo Real, não foi possível detectar quantidade suficiente

para a leitura com o sistema CBA. Apenas a PCU80 cultivada com PBMC2 não apresentou valores abaixo da curva de concentração do teste, que tem valores entre 10 a 2.500 pg/mL; os valores foram de aproximadamente 98pg/mL de IL-1 α , 118 pg/mL de IL-1 β e 602 pg/mL de IL-11.

Em contraste, quando analisamos amostras de cocultura, os níveis de IL-6 e de IL-8 foram muito mais altos que os valores indicados para o teste, mesmo utilizando amostras diluídas 1:5. Não foi possível mensurar os níveis de TGF- β 1.

O próximo passo foi avaliar se o envelhecimento celular e o tratamento com IFN- γ impactam no potencial imunomodulador dessas células.

4.10. Ensaio funcional de cocultura de GW-CTM após tratamento com IFN- γ e em passagem precoce e tardia com PBMC

4.10.1. O número de passagens e o tratamento com IFN- γ não afetam a capacidade imunomoduladora, que varia de acordo com cada GW-CTM

Estudos anteriores já mostraram que o pré-tratamento, por exemplo, com IFN- γ é necessário para ativar (ou seu sinônimo - licenciar) as CTM e aumentar sua eficiência quando estão em contato com o sistema imunológico (M Krampera et al. 2006; Polchert et al. 2008). No entanto, ainda não está claro se a capacidade imunossupressora é mantida após várias passagens em cultura. Portanto, investigamos se o uso de diferentes passagens e o pré-tratamento com

IFN- γ interfere na função imunomoduladora das GW-CTM. Com delineamento experimental semelhante aos anteriores, estes experimentos foram realizados utilizando duas passagens: P5 e P10. A P10 foi escolhida porque normalmente as CTM não estão completamente senescentes nesta passagem e após 10 passagens já é possível obter quantidade suficiente de células para utilização em terapia celular. Em ensaios clínicos, $1-2 \times 10^6$ células / kg de peso corporal são injetados em pacientes (Ikebe and Suzuki 2014). Foram utilizadas 3 amostras de GW-CTM (PCU80, PCU82 e PCU83) e todas elas foram desafiadas utilizando as mesmas 2 amostras de PBMC (PBMC3 e PBMC4). As GW-CTM foram licenciadas com IFN- γ (50ng/mL) durante 24 horas. Após o tratamento, PBMC foi adicionado à cultura de GW-CTM, na presença de PHA durante 72 horas. Ao final do experimento, a proliferação de células T CD3⁺ foi avaliada.

Todas as amostras de GW-CTM foram capazes de inibir a proliferação das células T CD3⁺ nos PBMC3 e PBMC4 (tal como observado nos experimentos anteriores com o PBMC2 não tratado com IFN- γ), mas em diferentes níveis ($p < 0,0001$). Além disso, é importante ressaltar que a capacidade imunomoduladora foi mantida na passagem 10, em todos os casos, em maior ou menor grau.

A PCU80 apresentou a melhor capacidade supressora sobre PBMC3 e PBMC4 (90 e 92%), sem diferenças significativas entre passagens ou mesmo após licenciamento com IFN- γ (figura 19 A). Por outro lado, nos resultados obtidos com as PCU82 e PCU83 (figura 19 B e C), observamos diminuição significativa no percentual de inibição na P10 em relação a P5, sem o tratamento prévio com IFN- γ . É possível que neste caso, um estágio de senescência mais avançado tenha impactado na capacidade supressora dessas células. Como já

mostramos anteriormente, GW-CTM alcançam a senescência em passagens diferentes.

Em contraste, o tratamento com IFN- γ se mostrou mais eficiente na passagem tardia (P10), é possível observar maior inibição da proliferação de células T CD3⁺ na PCU82 cultivada com os dois PBMC (figura 19 B) e na PCU83 em cocultura com PBMC4 (figura 19 C). A progressão da senescência em GW-CTM também poderia impactar no resultado da ativação por IFN- γ .

Estes dados reforçam que o potencial de imunossupressão varia de acordo com a amostra GW-CTM utilizada, independente do tratamento com IFN- γ e do número de passagens. Além disso, observamos novamente perfis diferentes de resposta nos PBMC testados.

Figura 19. Inibição da proliferação de LT totais CD3⁺ mediada por GW-CTM tratadas com IFN- γ . GW-CTM foram tratadas com 50ng/mL de IFN- γ por 24 horas. Após esse período, PBMC foi estimulado com PHA durante 3 dias na presença de CTM, a proporção de células utilizada foi 1:10 (CTM:PBMC). As passagens das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 e P10. A proliferação de LT foi medida utilizando o sistema Click It por citometria de fluxo. A porcentagem

de inibição (Inib) foi calculada utilizando o percentual de proliferação de PBMC + PHA + CTM em relação ao PBMC+PHA. **(A)** PCU80, **(B)** PCU82 e **(C)** PCU83. Experimentos realizados em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

4.10.2. Efeito das GW-CTM na proliferação de LT CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ após tratamento com IFN- γ em P5 e P10

O efeito supressor das GW-CTM após o tratamento com IFN- γ e em processo de senescência também foi avaliado nas subpopulações de LT, CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. Pudemos observar que todas as amostras de GW-CTM foram capazes de inibir a proliferação tanto de CD3⁺ CD4⁺ quanto CD3⁺ CD8⁺ nos dois PBMC, independentemente da passagem utilizada e do tratamento com IFN- γ .

Os padrões de inibição da subpopulação de células T CD3⁺ CD4⁺ foram semelhantes aos obtidos na análise de linfócitos T CD3⁺, conforme descrito no item anterior (item 4.10.1). Na PCU80 não houve diferença estatística na inibição da proliferação entre passagens e presença ou ausência de IFN- γ (figura 20 A). Em contraste, o efeito imunossupressor diminuiu quando PCU82 (figura 20 B) e PCU83 (figura 20 C) foram cultivadas com PBMC3 e 4 na passagem 10 na ausência do tratamento com IFN- γ . Como no experimento anterior, também observamos aumento significativo na inibição da proliferação de celular T CD3⁺ CD4⁺ em P10 após tratamento com IFN- γ , nas PCU82 e PCU83 (figura 20 B e C).

No entanto, quando analisamos a porcentagem de inibição da proliferação de células T $CD3^+ CD8^+$ (figura 20 D, E e F), observamos diferença significativa apenas entre as amostras de GW-CTM e não entre passagens e GW-CTM tratadas ou não com $IFN-\gamma$.

Esses dados mais uma vez corroboram nossos dados anteriores, mostrando o perfil único na capacidade imunomoduladora de cada amostra de GW-CTM e no perfil de resposta de cada PBMC.

Figura 20. Inibição da proliferação de LT $CD3^+ CD4^+$ e $CD3^+ CD8^+$ mediada por GW-CTM tratadas com $IFN-\gamma$. GW-CTM foram tratadas com 50ng/mL de $IFN-\gamma$ por 24 horas. Após esse período, PBMC foi estimulado com PHA durante 3 dias na presença de CTM, a proporção de células utilizada foi 1:10 (CTM:PBMC). As passagens das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 e P6. A proliferação de LT foi medida utilizando o sistema Click It por citometria de fluxo. A porcentagem de inibição (Inib) foi calculada utilizando o percentual de proliferação de PBMC+PHA+CTM em relação ao PBMC+PHA. Proliferação de células T $CD3^+ CD4^+$ (A) PCU80, (B) PCU 82 e (C) PCU83 e proliferação de células T $CD3^+ CD8^+$ (D) PCU80, (E) PCU82 e (F) PCU83. Experimentos realizados em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

4.10.3. Produção de moléculas imunomoduladoras por GW-CTM tratadas com $IFN-\gamma$ em P5 e P10 cultivadas com PBMC

Para melhor compreensão dos possíveis mecanismos associados ao potencial imunomodulador das GW-CTM, investigamos se as moléculas envolvidas no efeito imunossupressor são alteradas após o pré-tratamento com $IFN-\gamma$ e se ocorrem diferenças entre uma passagem precoce (P5) e uma mais tardia (P10), quando desafiadas com PBMC alogênico. Para isso, realizamos a

extração do RNA total das GW-CTM para avaliar a expressão das moléculas imunossupressoras por PCR em Tempo Real. Após 72 horas em cocultura, o PBMC foi retirado da cultura e as CTM foram coletados para extração de RNA.

Nossos resultados mostraram variabilidade na expressão gênica das moléculas imunomoduladoras nas amostras de GW-CTM ($p < 0,005$). As GW-CTM expressam os genes imunomoduladores em graus diferentes.

O padrão de expressão das citocinas *IL-1 α* e *IL-1 β* é semelhante quando comparamos a expressão destes genes no mesmo cordão (figura 21 A e B). Houve aumento significativo em ambos os genes na passagem 10 da PCU82 cultivada com o PBMC ($p < 0,0001$). A expressão dos genes *IL-6*, *IL-8*, *LIF* e *HGF* foi variável nas amostras de GW-CTM (figura 21 C e D). Em alguns casos, observamos aumento significativo na expressão dos genes *TGF- β 1* e *IL-11* na cocultura após o tratamento com IFN- γ (figura E e F).

Quando analisamos o perfil basal destas amostras, observamos que a expressão de *IL-10* e *IDO* era ausente ou em níveis muito baixos (figura 14). Porém, a expressão de ambos os genes aumentou quando GW-CTM foram cultivados com PBMC em comparação com GW-CTM sozinhas. Após cocultura, houve um aumento na expressão gênica de *IDO* em todas as amostras, embora cada célula exibisse um perfil único. O tratamento com IFN- γ aumentou a expressão de *IDO* tanto na presença como na ausência de cocultura ($p < 0,0001$), em ambas as passagens, em todas as amostras de GW-CTM (figura 21 G), exceto na PCU82 cultivada com PBMC4. Além disso, houve diminuição significativa da expressão de *IDO* na PCU82 em P10 cultivadas com PBMC e tratadas com IFN- γ . Por outro lado, observamos um aumento significativo na

expressão do gene na PCU83 cultivada com PBMC na presença ou ausência do tratamento com IFN- γ .

A resposta da IL-10 exibiu um padrão diferente. Não houve expressão de *IL-10* nas GW-CTM sozinhas mesmo após o licenciamento com IFN- γ . No entanto, após a cocultura, todas as amostras passaram a expressar *IL-10* em diferentes níveis (figura 21 H). As células em contato com PBMC4 expressaram consistentemente mais *IL-10* do que as células cultivadas com PBMC3 ($p < 0,0001$).

C **D**

Figura 21. Expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em GW-CTM estimuladas com IFN- γ cultivadas com PBMC. GW-CTM foram tratadas com 50ng/mL de IFN- γ por 24 horas. Após esse período, o PBMC estimulado com PHA foi adicionado a cultura. As amostras foram coletadas após 72 horas. As células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) IL-8, (E) IL-11, (F) TGF- β 1, (G) IDO, (H) IL-10, (I) HGF e (J) LIF. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle - células em P5 (fold-change). Exceto IL-10 e IDO onde a expressão foi normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao calibrador, pois as células controle (CTM) não apresentaram expressão desses genes. Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. As passagens

das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 e P10. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

4.10.4. Secreção de moléculas imunomoduladoras por GW-CTM tratadas com IFN- γ em P5 e P10 cultivadas com PBMC

Para completar a análise do ensaio funcional de cocultura de GW-CTM, foi feita a quantificação das moléculas imunomoduladoras (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-11) secretadas no sobrenadante da cultura celular de GW-CTM cultivadas com PBMC sem ou após o licenciamento com IFN- γ .

Mais uma vez, nossos dados apresentam diferenças entre as amostras de GW-CTM ($p < 0,0001$). A secreção de IL-1 α e IL-1 β foi variável nas amostras de GW-CTM. A secreção de IL-10 aumentou significativamente com o tratamento com IFN- γ . Por outro lado, observamos uma diminuição significativa na secreção de IL-11 após o licenciamento.

Figura 22. Secreção de moléculas imunomoduladoras após GW-CTM estimulada com IFN- γ cultivada com PBMC. GW-CTM foram tratadas com 50ng/mL de IFN- γ por 24 horas. Após esse período, o PBMC estimulado com PHA foi adicionado a cultura. O sobrenadante foi coletado após 72 horas. A dosagem das moléculas imunomoduladoras foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o sistema CBA Flex. **(A)** IL-1 α , **(B)** IL-1 β , **(C)** IL-10 e **(D)** IL-11. Experimento

realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. As passagens das CTM utilizadas nos experimentos foram P5 e P10. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0.005$ e (***) $p < 0.0001$. (n=3)

5. DISCUSSÃO

Compreender as alterações que ocorrem nas propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais de geleia de Wharton (GW-CTM) durante o progresso de senescência é um passo importante para a melhor e mais adequada aplicação destas células em abordagens terapêuticas. O presente estudo avaliou o perfil constitutivo da produção de moléculas imunomoduladoras das GW-CTM indiferenciadas, após a diferenciação e em resposta à indução de senescência, buscando compreender melhor as funcionalidades e as limitações destas células como fonte para a terapia celular. Além disso, nos propusemos investigar se a variabilidade intrínseca encontrada nas amostras de GW-CTM poderia impactar em seu potencial imunomodulador. Para isso, avaliamos os efeitos do envelhecimento celular e do licenciamento com IFN- γ na função das GW-CTM, medido pela proliferação de células T e produção de moléculas envolvidas na imunossupressão.

Nos últimos anos, estudos sobre a biologia das CMT têm identificado uma variedade de fatores que afetam sua longevidade e sua capacidade de expansão. Questões como fonte do tecido doador, idade do doador, antecedentes ambientais e métodos de isolamento impactam na qualidade geral dessas células (Phinney et al. 1999; Baker et al. 2015). Apesar das MO-CTM serem consideradas o "padrão-ouro" (Owen 1988; Bianco et al. 2001), as CTM obtidas a partir da parede do cordão umbilical podem ser facilmente isoladas e processadas. Essas células proliferam rapidamente em cultura, além de serem de idade muito jovem (neonatal), terem sofrido menos interferência ambiental e

serem obtidas de uma fonte com poucas preocupações éticas. Por isso, optamos por estudar as GW-CTM.

Na busca de determinar a viabilidade deste projeto de Doutorado, foi feita uma série de experimentos que constituem os primeiros resultados que foram utilizados no desenvolvimento desta tese. Parte dos dados já consta de artigo em publicado no primeiro semestre de 2015 (Paladino et al. 2015). O melhor protocolo de isolamento de GW-CTM identificado durante esses experimentos foi incorporado às Boas Práticas do Laboratório, passando a ser o Procedimento Operacional Padrão do nosso Banco de Células SBIBAE. Após realizarmos o isolamento de GW-CTM utilizando 3 protocolos em 8 cordões diferentes, comparamos morfologia, duplicação da população, tempo em cultura, número de passagens e senescência. Todas as amostras que proliferaram além da P2 foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos e apresentaram características típicas de CTM, tanto morfológicas quanto fenotípicas. E assim, foram caracterizadas e classificadas como CTM de acordo com as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular.

Nossos dados mostraram claramente que apesar de três métodos amplamente utilizados terem sido testados, o protocolo 2, onde o tecido é picotado e digerido usando 4% colagenase, produziu células que viveram mais tempo e com um maior potencial de expansão. As células isoladas com protocolo 2 apresentaram maior viabilidade celular e permitiram, em geral, entre 19 e 25 passagens, permanecendo em cultura durante pelo menos 80 dias e exibindo maior DP acumulado. Estes resultados divergiram quando os mesmos cordões foram submetidos, em paralelo, aos protocolos 1 ou 3 onde os valores de DP acumulado foram inferiores e apesar das amostras terem permanecido em

cultura cerca de 100 dias, o maior número de passagens observado foi de 21. Após todas as análises, optamos por utilizar o protocolo 2 como padrão para o isolamento de GW-CTM.

Tornou-se claro para nós que existem duas fontes diferentes de variação: uma devido ao protocolo e outra inerente a cada amostra. Portanto, há uma importante variabilidade intrínseca entre amostras, mesmo que tenham sido processadas com 2 ou 3 protocolos em paralelo, cultivadas seguindo sempre os mesmos padrões, terem capacidade de se diferenciar em adipócitos e osteócitos, terem sido obtidas da mesma fonte e serem células jovens com 9 meses de vida.

Além da análise da capacidade de proliferativa, tornou-se importante estudar o processo de senescência replicativa em GW-CTM. Para isso, avaliamos expressão da proteína p16 e de genes envolvidos na via da p53 e de suas isoformas. Corroborando dados da literatura (Rayess et al. 2012; Helman et al. 2016), observamos aumento progressivo da expressão da proteína p16 durante o processo de envelhecimento celular. No estudo *in vitro*, Fujita e colaboradores, mostraram que a isoforma p53 β acelera e a Δ 133p53 reprime a senescência replicativa em fibroblastos humanos normais, de acordo com o seu modo de interação com a forma completa da proteína p53 (*full-length*) (Fujita et al. 2009). Mondal e colaboradores mostraram, *in vivo*, o acúmulo de linfócitos T CD8⁺ senescentes no sangue durante o envelhecimento, envolvendo alterações na expressão endógena de Δ 133p53 e p53 β . Mostraram também que a redução da isoforma Δ 133p53 ou superexpressão da p53 β em células T CD8⁺ inibiu a proliferação celular e induziu a senescência (Mondal et al. 2011).

Em nossos dados observamos o mesmo perfil descrito nos estudos acima, ou seja, aumento da expressão da isoforma p53 β e diminuição da $\Delta 133p53$ em células senescentes. Porém, a expressão gênica da p53 total foi variável nas amostras, o que era esperado já que a regulação desta proteína é complexa, majoritariamente pós-traducional, e envolve outras proteínas como MDM2 e p21. Mais experimentos seriam necessários para compreender melhor o envolvimento das isoformas de p53 na progressão da senescência celular e sua relação com a expressão de p16. Acreditamos que seria interessante manipular a expressão das isoformas de p53 (indução ou bloqueio) para regular a proliferação e senescência celular. Um estudo mostrou que a remoção de células senescentes do sistema pode aumentar a longevidade dos tecidos. Nesse estudo, foi utilizado um peptídeo que interfere no “*crosstalk*” entre p53 e FOXO4 (proteína expressa em células senescentes) e induz apoptose nas células senescentes (Baar et al. 2017). Seria interessante estudar se o uso de modeladores da via de p53 antes do estabelecimento da senescência poderia reverter ou até impedir a progressão deste processo, o que seria importante no caso da utilização das CTM em terapia celular.

A variabilidade individual ainda é uma questão pouco abordada, por isso na fase seguinte do estudo procuramos identificar se a variabilidade intrínseca observada nos experimentos anteriores poderia alterar o perfil basal de genes envolvidos na imunomodulação. A coleta das amostras foi feita no tempo zero (passagem 5), num tempo intermediário já previamente definido (passagem 15) e em senescência (passagem, em geral, entre 20 e 25). Cinco amostras de 4 cordões foram testadas (PCU 80 protocolos 2 e 3, PCU82 protocolo 2, PCU83

protocolo 3 e PCU84 protocolo 2) e foi possível observar que existe variabilidade na expressão gênica de moléculas imunomoduladoras entre amostras.

Há na literatura diversos estudos que mostram que as CTM podem exibir perfis imunossupressores ou pró-inflamatórios. Os estudos mostram que CTM secretam citocinas espontaneamente ou após a indução por outras citocinas, sendo as mais conhecidas IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e acredita-se que os seus efeitos são determinados pelas condições locais do microambiente (Kyurkchiev 2014). Waterman e colaboradores mostraram que em um ambiente inflamatório com altos níveis de TNF- α e IFN- γ , as CTM podem apresentar um perfil anti-inflamatório produzindo PGE2, IDO, TGF- β e HGF que suprimem a proliferação de células T e induzem a ativação de células T reguladoras (Waterman et al. 2010). No caso de estarem em um ambiente com ausência de inflamação, com baixos níveis de TNF- α e IFN- γ , as CTM podem apresentar um fenótipo pró-inflamatório, secretando quimiocinas que recrutam células T para o local da inflamação e aumentam a resposta imune (Ren et al. 2008; Li et al. 2012). O equilíbrio entre estes perfis opostos pode ser importante para promover a homeostase, prevenindo dano tecidual e promovendo a regeneração e reparação dos tecidos.

Concordando com nossos experimentos anteriores, que mostraram variabilidade na capacidade de expansão e longevidade celular (Paladino et al. 2015), nossos resultados mostram que cada GW-CTM exibe um perfil basal único de moléculas imunomoduladoras à medida que aumenta o número de passagens. A PCU80 teve aumento da expressão gênica tanto de moléculas pró-inflamatórias quanto imunossupressoras, já a PCU82 exibiu maior expressão de genes de moléculas imunossupressoras. Por outro lado, as PCU83 e PCU84

tiveram aumento na expressão dos genes relacionados com atividade pró-inflamatória. Vale ressaltar que todas as amostras foram cultivadas seguindo o mesmo protocolo padrão e utilizando os mesmos reagentes. Além disso, a partir da mesma fonte neonatal, a idade do doador previamente identificada como fonte de variabilidade foi eliminada (Baker et al. 2015).

Para avaliar se os diferentes perfis de expressão genica têm impacto sobre a capacidade imunomoduladora das GW-CTM, um ensaio funcional de cocultura foi montado para que pudéssemos avaliar tanto as CTM quanto as células do sistema imune, em especial os linfócitos T. Foram escolhidas 3 linhagens celulares de cordões que foram cultivadas com 2 PBMC diferentes. Nossos dados estão de acordo com os de outros autores (Nicola et al. 2002; Meisel et al. 2004) que mostraram que as CTM em cocultura, em nosso caso, obtidas a partir da parede do cordão umbilical, são capazes de inibir a proliferação de células T $CD3^+$. Najar e colaboradores compararam a capacidade imunomoduladora de CTM obtidas a partir de tecido adiposo, medula óssea e geleia de Wharton. O efeito imunossupressor das CTM não se restringiu a uma população de células T específica e as diferentes fontes de CTM inibiram igualmente a proliferação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ (Najar et al. 2010). Porém, os nossos resultados mostram que houve um padrão diferente de respostas em cada PBMC quando as células T $CD3^+$ e suas subpopulações $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ foram analisadas. Surpreendentemente, apesar de um efeito claro, embora menor nas células T $CD3^+$ com todas as amostras de GW-CTM, não foi observada inibição significativa da proliferação de células T $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ com PBMC1. Cada PBMC apresentou perfis de resposta diferente quando colocados em cocultura com a mesma CTM. As células obtidas dos 3

cordões foram capazes de inibir em maior proporção o PBMC 2, ou seja, o efeito da CMT foi maior no PBMC 2, quando comparamos as 2 amostras de PBMC. Nossos achados sugerem que a eficácia da capacidade imunomoduladora das GW-CTM também depende do perfil celular do receptor. As células do sistema imune do receptor também podem apresentar um perfil mais inflamatório ou anti-inflamatório, devido a interferências ambientais e doenças prévias, o que poderia alterar sua interação com a CTM.

Com a análise por PCR em tempo real, pudemos observar que existe diferença significativa na expressão de genes associados à capacidade imunomoduladora das CTM, quando comparamos amostras de cordões diferentes. Observamos aumento da expressão de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-11 e os genes IDO e IL-10 passaram a ser expressos quando as CTM foram cultivadas juntamente com PBMC, porém a expressão destes genes é variável nas amostras de GW-CTM. IL-10 e IDO têm papel importante na capacidade das CTM de suprimirem a proliferação de linfócitos T após o estímulo com PHA (K H Yoo et al. 2009). Apesar de TGF- β também ser uma molécula supressora envolvida nesse processo, não observamos mudanças em sua expressão. Esses resultados nos mostram, mais uma vez, que as células se comportam de maneira diferente, apesar de serem isoladas e cultivadas utilizando o mesmo protocolo.

Senescência é um processo biológico importante que acontece em muitos tipos celulares, incluindo as CTM, e consiste na parada irreversível do crescimento celular (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). No entanto, ainda não se sabe se este processo pode afetar o potencial imunomodulador das GW-CTM e se o tratamento com IFN- γ pode potencializar o efeito supressor durante

o envelhecimento. Com o objetivo de estudar a relação entre o envelhecimento e a atividade imunomoduladora, focamos nossos experimentos no licenciamento com IFN- γ para avaliar o efeito do envelhecimento nas GW-CTM. Um estudo mostrou que a MO-CTM humana senescente induzida por radiação, perde sua função protetora em modelo murino de sepse, embora a inibição da proliferação de células T tenha sido parcial, sua capacidade de regular a resposta inflamatória em macrófagos *in vitro* foi mantida (Sepúlveda et al. 2014). Nossos dados indicam que o potencial imunomodulador é mantido após 10 passagens *in vitro*. No entanto, a atividade da PCU82 e PCU83 foi reduzida na passagem 10 quando comparada com a passagem 5. Interessantemente, nessas duas amostras, o licenciamento com IFN- γ aumentou a atividade supressora de GW-CTM na passagem tardia. Estes resultados reforçam nossa premissa de que o potencial de imunossupressão varia de acordo com a amostra GW-CTM utilizada, independentemente da passagem e do tratamento com IFN- γ .

Um estudo publicado em 2013 (Yang et al. 2013) comparou amostras de diferentes fontes de CTM humanas (medula óssea, tecido adiposo, placenta e cordão umbilical) e mostrou que em uma mesma amostra de CTM podem existir 2 subpopulações diferentes de células mesenquimais, que são CD106⁺ e CD106⁻. CD106 é uma molécula de adesão envolvida no contato célula-célula e, portanto, desempenha um papel importante na imunossupressão mediada por CTM (Ren et al. 2010). As células que expressam CD106 em sua superfície têm maior expressão dos genes IL-1 α , IL-1 β , COX-2, IL-6, IL-8, IDO e produção de PGE₂ quando são comparadas com células CD106⁻. As células CD106⁺ tem alta atividade supressora, enquanto que as células CD106⁻ tem maior capacidade de formação de colônias. Quando avaliamos os genes envolvidos na capacidade

imunomoduladora, observamos também a expressão de IDO em amostras de GW-CTM após cocultura com PBMC. Verificamos que PCU80 e PCU83 expressaram mais IDO do que PCU82. Além disso, após tratamento com IFN- γ , foi observada uma diminuição significativa da capacidade imunossupressora de PCU82 cultivada com PBMC3 na P5. Também avaliamos a expressão de CD106, nossos dados demonstraram aumento da expressão basal de CD106 em 2 amostras, PCU80 (13,7% CD106⁺) e PCU83 (4,9% CD106⁺), porém menos expressa na PCU82 (1,6% CD106⁺) na passagem 5. Isso poderia nos ajudar a entender a heterogeneidade em nossas amostras já que, conforme foi observado, existiu uma expressão variada do CD106 entre os cordões. Deste modo, os nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de CD106 em GW-CTM pode estar relacionado com a expressão do gene IDO, identificado como um dos principais mecanismos de supressão de células T por CTM humanas.

Estudos recentes também avaliaram o potencial imunomodulador das CTM após estímulos pró-inflamatórios. Szabo e colaboradores mostraram que clones de MO-CTM de camundongos exibem diferenças na sua capacidade de inibir a proliferação de células T, mas após o pré-tratamento com citocinas pró-inflamatórias estas diferenças desaparecem (Szabó et al. 2015). Fuenzalida e colaboradores indicaram que o pré-tratamento com ligante de TLR3 (poli I:C) aumenta a capacidade imunossupressora das CTM derivadas do cordão umbilical (CU-CTM) (Fuenzalida et al. 2016). Ao contrário destes estudos, observamos que a variabilidade é mantida após o pré-tratamento com IFN- γ e que este estímulo pró-inflamatório não parece potencializar a capacidade inibitória das GW-CTM sobre as células T. No entanto, deve ser levado em conta

que Szabo *et al.* realizaram o estudo com MO-CTM murinas e que Fuenzalida *et al.* não mostraram diferenças entre CU-CTM cultivadas com PBMC na presença ou ausência de LPS (ligante TLR4), também um estímulo pró-inflamatório. Nós não testamos ligantes de TLR em nossas amostras humanas, ao invés, preferimos usar a ativação padrão por IFN- γ .

GW-CTM em condições basais não expressam IL-10 (Keon Hee Yoo *et al.* 2009; Ivanova-Todorova *et al.* 2012). Em nossos resultados observamos o mesmo já descrito por outros autores, verificamos que GW-CTM sozinhas ou estimuladas com IFN- γ não produzem IL-10. No entanto, as GW-CTM passam a expressar IL-10 depois de serem cultivadas junto com PBMC. Embora as CTM sejam aderentes ao plástico e as células T fiquem suspensas no sobrenadante, após cocultura com o contato, todas as precauções foram tomadas para evitar a contaminação cruzada durante a extração de RNA das GW-CTM. Acreditamos que mesmo que qualquer célula T tivesse permanecido, seria numa quantidade muito pequena comparada com a quantidade de GW-CTM na cultura e não alteraria os resultados significativamente.

Em resumo, nossos achados mostram que as GW-CTM apresentam capacidade proliferativa distintas e atingem a senescência em passagens diferentes. A produção basal das moléculas imunomoduladoras varia nas amostras de GW-CTM. Através do ensaio funcional de cocultura observamos que as GW-CTM são capazes de suprimir a proliferação de células T e suas subpopulações, corroborando dados da literatura (Najar *et al.* 2009), porém em graus diferentes, independentemente da passagem e do tratamento com IFN- γ . É importante ressaltar que a capacidade imunomoduladora foi mantida na passagem 10, em maior ou menor grau. Adicionalmente, observamos diferentes

perfis de resposta dos PBMC. Por fim, a produção e secreção das moléculas imunomoduladoras após cocultura com PBMC também é variável nas GW-CTM. Vale ressaltar que os experimentos consistiram em avaliar cada amostra de GW-CTM individualmente, o que evidenciou a variabilidade intrínseca observada. Nossos resultados reforçam nossa premissa de que o potencial imunomodulador varia de acordo com a amostra GW-CTM utilizada e também conforme o grau de senescência. Estes achados devem ser levados em conta no caso da utilização dessas células para terapia celular. Acreditamos que a variabilidade na ação das GW-CTM e o perfil de resposta variável do receptor (PBMC), pode explicar em partes os diferentes resultados obtidos nos tratamentos utilizando CTM.

6. CONCLUSÕES

- GW-CTM apresentaram capacidade de proliferação diferente entre amostras e protocolos;
- GW-CTM atingem senescência replicativa em passagens diferentes;
- A expressão gênica e produção basal de moléculas imunomoduladoras é variável nas GW-CTM;
- Após cultivo com PBMC de doadores distintos, observamos que as GW-CTM tem capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T CD3⁺ ativados por mitógeno,
- Observamos respostas diferentes em relação à amostra de PBMC utilizada;
- Verificamos aumento da expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em GW-CTM após cultivo com PBMC, porém a expressão varia de acordo com a amostra de GW-CTM utilizada;
- A capacidade imunossupressora das GW-CTM é mantida após 10 passagens *in vitro*;
- A capacidade imunomoduladora das GW-CTM varia independente do tratamento com IFN- γ ;
- Em conjunto, nossos dados indicam que o uso terapêutico de GW-CTM pode ser impactado pela variabilidade intrínseca presente em doadores (CTM) e receptores (monócitos e linfócitos).

7. ANEXOS

Realizamos experimentos buscando atingir dois objetivos específicos propostos no início do projeto. Eram eles:

- Determinar o perfil de moléculas imunomoduladoras nas GW-CTM após a diferenciação *in vitro*;
- Desenvolver ensaios funcionais com IL-11 recombinante ou sob bloqueio parcial por RNA de interferência, para investigar a participação da IL-11 na atividade imunomoduladoras das GW-CTM.

Os dados obtidos estão descritos abaixo. Como não obtivemos resultados que julgamos relevantes, optamos por explorar melhor o efeito imunomodulador em ensaios funcionais com GW-CTM senescentes, que era o foco principal desse projeto.

Produção de moléculas envolvidas no efeito imunomodulador das GW-CTM após diferenciação em adipócitos

Para avaliar a produção de moléculas imunomoduladoras em adipócitos, as células foram cultivadas durante 21 dias com meio específico para diferenciação adipogênica. Após esse período, as amostras foram coletadas para extração do RNA total para avaliar a expressão das moléculas imunossupressoras por PCR em Tempo Real. Observamos a diminuição da

expressão gênica de IL-6, IL-8, IL-11 e LIF e aumento da expressão de HGF quando as CTM se diferenciam em adipócitos. Nossos resultados mostram que é variável a expressão dos genes IL-1 α , IL-1 β e TGF- β 1 após a diferenciação. Não foi possível detectar a expressão de IDO em nenhuma das amostras. Houve diminuição da expressão dos genes IL-6, IL-8, IL-11 e LIF. É possível que as células diferenciadas percam sua capacidade imunossupressora.

Figura 1 suplementar. Expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em GW-CTM após diferenciação adipogênica. As células foram cultivadas com meio de diferenciação por 21 dias e as amostras foram coletadas. As células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, HGF, TGF- β 1, IDO e LIF. **(A)** PCU80, **(B)** PCU82 **(C)** PCU83. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle (CTL) – células não diferenciadas (fold-change). Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ EPM. (n=3)

Efeito da IL-11 recombinante

Para avaliar se a IL-11 exógena seria capaz de alterar o perfil basal de expressão gênica e poderia beneficiar as qualidades imunomoduladoras das GW-CTM em cultura, realizamos um experimento de dose-resposta. As células da PCU82 foram semeadas e após 24 horas foram incubadas com diferentes concentrações de IL-11 humana recombinante (1, 10 e 100 ng/mL) por mais 24 horas. O tratamento com IL-11 parece não alterar a expressão das moléculas envolvidas na capacidade imunomoduladora das GW-CTM.

Figura 2 suplementar. Expressão gênica de moléculas imunomoduladoras em CTM tratadas com IL-11 recombinante. As células foram semeadas e tratadas com concentrações diferentes de IL-11 (1, 10 e 100ng/mL). Após 24h, as células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, HGF, TGF-β1, IDO e LIF. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle - células sem tratamento (fold-change). Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média ± DP. A passagem da CTM utilizada no experimento foi P5. (n=1)

O próximo passo foi avaliar o potencial da IL-11 como uma das moléculas participantes na ação supressora das CTM, ou seja, avaliar se apenas o tratamento com a proteína recombinante seria capaz de inibir a proliferação das células T frente ao mitógeno. O PBMC foi tratado com três doses diferentes de IL-11 recombinante (próximas aos níveis produzidos pelas CTM) por 72 horas juntamente com PHA. Após esse período, a análise de proliferação foi realizada por citometria de fluxo. Observamos diminuição significativa da proliferação de células T e das subpopulações apenas no PBMC1 tratado com 5ng/mL de IL-11 ($p < 0,005$).

Figura 3 suplementar. Inibição da proliferação de células T CD3⁺ e suas subpopulações após tratamento com IL-11 recombinante. PBMC foi estimulado com PHA durante 3 dias na presença da IL-11 recombinante (50ng/mL, 5ng/mL e 0,5ng/mL). A proliferação de LT foi medida utilizando o kit Click It por citometria de fluxo. A porcentagem de inibição (Inib) foi calculada utilizando o percentual de proliferação de PBMC + PHA + IL-11 em relação ao PBCM+PHA. Experimentos realizados em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ DP. Diferenças estatísticas significantes estão indicadas por (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0.005$. (n=2)

Expressão gênica de p53, isoformas de p53 e p16 em GW-CTM após diferenciação em adipócitos

Para avaliar a expressão de p53, isoformas de p53 e p16 em adipócitos, as células foram cultivadas durante 21 dias com meio específico para diferenciação adipogênica. Após esse período, as amostras foram coletadas para extração do RNA total para avaliar a expressão gênica por PCR em Tempo Real. Observamos a diminuição da expressão de todos os genes analisados.

Figura 4 suplementar. Expressão de genes associados à via da p53 em GW-CTM após diferenciação adipogênica. As células foram cultivadas com meio de diferenciação por 21 dias e as amostras foram coletadas. As células foram lisadas, RNA total extraído e foi feito PCR em Tempo Real. Expressão gênica de p53, $\Delta 133p53$, p53 β e p16. **(A)** PCU80, **(B)** PCU82 **(C)** PCU83. Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle (CTL) – células não diferenciadas (fold-change). Experimento realizado em triplicata. Resultados representados por média $\pm$ EPM. (n=3)

8. REFERÊNCIAS

Aggarwal S, Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822.

Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S. 2012. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10:544–555.

Augello A, De Bari C. 2010. The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Hum. Gene Ther.* 21:1226–1238.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35:1482–1490.

Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, et al. 2017. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169:132–147.e16.

Baker N, Boyette LB, Tuan RS. 2015. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone* 70:37–47.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22:675–682.

Beyer Nardi N, Da Silva Meirelles L. 2006. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb. Exp. Pharmacol.* 174:249–282.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180–192.

Le Blanc K. 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5:485–489.

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B,

Bernardo ME, Remberger M, et al. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579–1586.

Le Blanc K, Mougiakakos D. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12:383–396.

Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringdén O. 2004. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 60:307–315.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31:890–896.

Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 7:14.

Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. 1999. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 274:11660–11666.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:729–740.

Chang C-J, Yen M-L, Chen Y-C, Chien C-C, Huang H-I, Bai C-H, Yen BL. 2006. Placenta-Derived Multipotent Cells Exhibit Immunosuppressive Properties That Are Enhanced in the Presence of Interferon- γ . *Stem Cells* 24:2466–2477.

Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, Jack RS, Wunderlich FT, Brünig JC, Müller W, et al. 2011. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 34:566–578.

Chen K, Wang D, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, Yang SG, Zhu D, Bayard F, Han ZC. 2010. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin. Immunol.* 135:448–458.

Cho D-I, Kim MR, Jeong H, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, Kim YS, Ahn Y. 2014.

Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp. Mol. Med.* 46:e70.

Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. 2010. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5:99–118.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, et al. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367–372.

Covas DT, Siufi JLC, Silva a RL, Orellana MD. 2003. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:1179–83.

Deus GC, Normanton M, Hamerschlag N, Kondo AT, Ribeiro AA, Goldberg AC, Marti LC. 2012. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable bone marrow collection filters. *Einstein (Sao Paulo)* 10:296–301.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:9363–9367.

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

Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. 2012. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant. Res.* 1:12.

François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. 2012. Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation. *Mol. Ther.* 20:187–195.

Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6:230–247.

Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. 2004. TGF- β induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J.*

Transplant. 4:1614–1627.

Fuenzalida P, Kurte M, Fernández-O'ryan C, Ibañez C, Gauthier-Abeliuk M, Vega-Letter AM, Gonzalez P, Irrázabal C, Quezada N, Figueroa F, et al. 2016. Toll-like receptor 3 pre-conditioning increases the therapeutic efficacy of umbilical cord mesenchymal stromal cells in a dextran sulfate sodium-induced colitis model. *Cytotherapy* 18:630–641.

Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, Bowman ED, Mathe EA, Schetter AJ, Pine SR, et al. 2009. p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 β are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 11:1135–1142.

Gazit R, Weissman IL, Rossi DJ. 2008. Hematopoietic Stem Cells and the Aging Hematopoietic System. *Semin. Hematol.* 45:218–224.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105:2821–2827.

Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. 2010. Immunological Aspects of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Hum. Gene Ther.* 21:1641–1655.

Gurfein BT, Zhang Y, Lopez CB, Argaw AT, Zameer A, Moran TM, John GR. 2009. IL-11 Regulates Autoimmune Demyelination. *J. Immunol.* 183:4229–4240.

Heinrich PC, BEHRMANN I, HAAN S, HERMANN S, MÜLLER-NEWEN G, SCHAPER F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374:1–20.

Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, Swisa A, Condiotti R, Granit RZ, Nevo Y, et al. 2016. p16Ink4a-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat. Med.* 22:412–420.

Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. 2010. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 10:1496–1500.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating a. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393–5.

Hsu W, Lin C, Chiang B. 2013. Prostaglandin E2 Potentiates Mesenchymal Stem Cell–Induced IL-10+ IFN- γ + CD4+ Regulatory T Cells To Control Transplant Arteriosclerosis.

J. Immunol. 190:2372–2380.

Hyun D, Hee K, Suk K, Choi J, Choi S-Y, Yang S, Yang Y-S, Joon H, Kim DH, Yoo KH, et al. 2005. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 31:119–26.

Ikebe C, Suzuki K. 2014. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: Optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res. Int.* 2014.

Itahana K, Dimri G, Campisi J. 2001. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.* 268:2784–91.

Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemmezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. 2012. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:295167.

Iyer SS, Cheng G. 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32:23–63.

Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120–6.

Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. 2007. Immunosuppression by Placental Indoleamine 2,3-Dioxygenase: A Role for Mesenchymal Stem Cells. *Placenta* 28:1174–1181.

Kalaszczynska I, Ferdyn K, Kalaszczynska I, Ferdyn K. 2015. Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance. *Biomed Res. Int.* 2015:1–11.

Kawakami T, Takahashi T, Shimizu H, Nakahira K, Takeuchi M, Katayama H, Yokoyama M, Morita K, Akagi R, Sassa S. 2006. Highly liver-specific heme oxygenase-1 induction by interleukin-11 prevents carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Int. J. Mol. Med.* 18:537–546.

Kim J, Hematti P. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.* 37:1445–1453.

Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg R V., Wernet P. 2005.

Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp. Hematol.* 33:573–583.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlaschi V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, et al. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:386–98.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlaschi V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, et al. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:386–398.

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

Kubsch S, Graulich E, Knop J, Steinbrink K. 2003. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: Association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. *Eur. J. Immunol.* 33:1988–1997.

Kyurkchiev D. 2014. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 6:552.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. 1995. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 16:557–64.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell R a. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24:99–146.

Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, et al. 2012. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.* 19:1505–1513.

Liang C, Chen SL, Wang M, Zhai WJ, Zhou Z, Pang AM, Feng SZ, Han MZ. 2013. [Synergistic immunomodulatory effects of interferon-gamma and bone marrow mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 34:213–216.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402–408.

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

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

Metcalfe SM, Watson TJ, Shurey S, Adams E, Green CJ. 2005. Leukemia Inhibitory Factor Is Linked to Regulatory Transplantation Tolerance. *Transplantation* 79:726–730.

Mocellin S. 2005. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* 78:1043–1051.

Mondal AM, Horikawa I, Pine SR, Fujita K, Vojtesek B, Bourdon J-C, Vera E, Lane DP, Blasco MA, Harris CC. 2011. P53 isoforms, $\Delta 133p53$ and $p53\beta$, regulate aging-associated T lymphocyte senescence. *Cancer Res.* 71.

Mosser DM, Edwards JP. 2010. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 10:460–460.

Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Kazan HF, Bruyn C De, Meuleman N, Bron D, Tounougou M, Lagneaux L. 2010. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell. Immunol.* 264:171–179.

Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, Bron D, Tounougou M, Martiat P, Lagneaux L, et al. 2009. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy* 11:570–83.

Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebé L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, et al. 2007. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr.* 13:217–226.

Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, Gorin NC, Fouillard L. 2008. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated

immunosuppression. *Cell. Immunol.* 253:16–22.

Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 177:2080–2087.

Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, et al. 2009. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15:42–9.

Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. 2004. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 22:405–414.

Nicola M Di, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838–3843.

O'Garra A, Vieira P. 2007. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* 7:425–428.

Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, Mohri T, Yamashita T, Nakaoka Y, Komuro I, Takeda K, Matsumiya G, et al. 2010. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation* 121:684–691.

Opal SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117:1162–1172.

Owen M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 10:63–76.

Paladino FV, Peixoto-Cruz JS, Santacruz-Perez C, Goldberg AC. 2015. Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells. *Cell Tissue Bank.* 17:123–136.

Panepucci R a, Siufi JLC, Silva W a, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago M a. 2004. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22:1263–1278.

Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal

cells. *J Cell Biochem* 75:424–436.

Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. 2001. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J. Reprod. Immunol.* 52:35–43.

Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, et al. 2008. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol.* 38:1745–1755.

Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. 2003. Veto-Like Activity of Mesenchymal Stem Cells: Functional Discrimination Between Cellular Responses to Alloantigens and Recall Antigens. *J. Immunol.* 171:3426–3434.

Prockop DJ. 1997. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science* (80-.). 276:71–74.

Raicevic G, Rouas R, Najar M, Stordeur P, Boufker HI, Bron D, Martiat P, Goldman M, Nevessignsky MT, Lagneaux L. 2010. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum Immunol* 71:235–244.

Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. 2008. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell. Immunol.* 251:131–136.

Rashedi I, Gomez-Aristizbal A, Wang XH, Viswanathan S, Keating A. 2017. TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling. *Stem Cells* 35:265–275.

Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208–13.

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer* 130:1715–1725.

Reinisch A, Strunk D. 2009. Isolation and animal serum free expansion of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial colony forming progenitor cells (ECFCs). *J. Vis. Exp.*:3–6.

Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. 2008. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2:141–150.

Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, et al. 2010. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol.* 184:2321–8.

Ringdén O, Le Blanc K. 2011. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24:65–72.

Rutella S, Danese S, Leone G. 2006. Tolerogenic dendritic cells: Cytokine modulation comes of age. *Blood* 108:1435–1440.

Sepúlveda JC, Tomé M, Fernández ME, Delgado M, Campisi J, Bernad A, González MA. 2014. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells* 32:1865–77.

Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. 2008. Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton's Jelly of Umbilical Cord. *Methods Cell Biol.* 86:101–119.

Sethe S, Scutt A, Stolzing A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5:91–116.

Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. 2000. Is β -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp. Cell Res.* 257:162–171.

Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, Shen B, Yin S, Liu W, Cui L, et al. 2008. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* 18:846–857.

Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. 2012. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 33:136–143.

Sosińska P, Mikula-Pietrasik J, Ryzek M, Naumowicz E, Książek K. 2014. Specificity of cytochemical and fluorescence methods of senescence-associated β -galactosidase detection for ageing driven by replication and time. *Biogerontology* 15:407–413.

Sotiropoulou P a, Perez S a, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. 2006.

Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24:74–85.

Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113:6576–6583.

Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111:1327–1333.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107:1484–1490.

Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33:919–926.

Szabó E, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Hornung Á, Makra I, Kudlik G, Uher F, Katona RL, Monostori É, Czibula Á. 2015. Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells Dev.* 24:2171–2180.

Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, et al. 2008. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* 93:1301–1309.

Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V. 2010. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp and Dental Follicle are Susceptible to Activation by Toll-Like Receptor Agonists. *Stem Cells Dev.* 20:695–708.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75:389–397.

Turinetto V, Vitale E, Giachino C. 2016. Senescence in Human Mesenchymal Stem

Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci* 17.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. 2006. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* 36:2566–2573.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8:726–736.

Wagner J, Kean T, Young R, Dennis JE, Caplan AI. 2009. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:531–536.

Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, et al. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS One* 3.

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. 2014. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* 15:1009–16.

Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5.

Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D, McIntosh KR. 2008. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 26:2865–74.

Xu G, Zhang L, Ren G, Yuan Z, Zhang Y, Zhao RC, Shi Y. 2007. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res.* 17:240–248.

Yang S-H, Park M-J, Yoon I-H, Kim S-Y, Hong S-H, Shin J-Y, Nam H-Y, Kim Y-H, Kim B, Park C-G. 2009. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp. Mol. Med.* 41:315–24.

Yang ZX, Han ZB, Ji YR, Wang YW, Liang L, Chi Y, Yang SG, Li LN, Luo WF, Li JP, et al. 2013. CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. *PLoS One* 8.

Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, et al. 2009. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells

derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 259:150–156.

Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, et al. 2009. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell. Immunol.* 259:150–156.

Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RCH. 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 13:263–71.

Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. 2008. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47:22–30.

Zhou C, Yang B, Tian Y, Jiao H, Zheng W, Wang J, Guan F. 2011. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cell. Immunol.* 272:33–38.