HELIENE GONÇALVES ALVARENGA

**Identificar e isolar células reticulares fibroblásticas em
linfonodos humanos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Luciana Cavalleiro
Marti

SÃO PAULO

2015

HELIENE GONÇALVES ALVARENGA

**Identificar e isolar células reticulares fibroblásticas em
linfonodos humanos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e Immunopatologia
Orientadora: Dra. Luciana Cavalleiro
Marti

Versão corrigida

(Versão original disponível na Faculdade de Medicina)

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alvarenga, Helene Gonçalves

Identificar e isolar células reticulares fibroblásticas em linfonodos humanos /
Helene Gonçalves Alvarenga. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Luciana Cavalheiro Marti.

Descritores: 1.Linfonodos 2. Células estromais 3.Células estromais
mesenquimais 4.Célula reticular fibroblástica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do linfonodo

Figura 2 - Homeostase celular do linfonodo e subtipos de FRCs segundo sua localização

Figura 3 - Principais mecanismos de ação das FRCs na ativação da resposta imune e na tolerância periférica

Figura 4 - Análise anatomopatológica e histoquímica de linfonodos (LNs) humanos

Figura 5 - Expressão de gp38 na zona de células T

Figura 6 - Perfil de expressão fenotípica das células isoladas a partir de linfonodos humanos

Figura 7 - Expressão de gp38 em células isoladas a partir de linfonodos humanos

Figura 8 - Separação física de FRCs e DNCs (Cell Sorting) proveniente de linfonodos humanos

Figura 9 - Diferenciação de FRCs e DNCs em condrócito, adipócito e osteócito

Figura 10 - Proliferação de linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs

Figura 11 - Expressão do receptor de quimiocina CCR7 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs

Figura 12 - Expressão do receptor de quimiocina CXCR4 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs

Figura 13 - Expressão do receptor de quimiocina CCR5 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs

Figura 14 - Expressão do receptor de quimiocina CCR6 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Característica amostral

Tabela 2 - Paineis utilizados na identificação e caracterização das FRCs

Tabela 3 - Paineis utilizados na identificação, caracterização e avaliação de moléculas de *homing* em linfócitos

Tabela 4 - Informações sobre os anticorpos utilizados

LISTA DE ABREVIATURAS

AIRE	Gene regulador de autoimunidade (do inglês, <i>Autoimmune regulator gene</i>)
Ang	Angiomotina (do inglês, <i>Angiomotin</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno (do inglês, <i>Antigen-presenting cell</i>)
BEC	Célula endotelial sanguínea (do inglês, <i>Blood endothelial cell</i>)
CLEC-2	Receptor de lecitina do tipo C (do inglês, <i>C-type lectin-like receptor 2</i>)
COX	Cicloxigenase (do inglês, <i>Cyclooxygenase</i>)
CTM	Células-tronco mesenquimais (do inglês, <i>Mesenchymal stem cells</i>)
DC	Células dendríticas (do inglês, <i>Dendritic cells</i>)
DEAF1	Fator auto-regulatório epidérmico deformado (do inglês, <i>Deformed epidermal autoregulatory factor 1</i>)
DF1-VAR1	DF1 variante proveniente de um <i>splicing</i> alternativo (do inglês, <i>Alternatively spliced variant in DF1</i>)
DNC	Células estromais duplo negativas para gp38 e CD31 (do inglês, <i>Double-negative cells</i>)
EAE	Experimental encefalomielite autoimune (do inglês, <i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
ECM	Componentes da matriz extracelular (do inglês, <i>Extracellular components matrix</i>)
EMT	Transição epitélio-mesenquima (do inglês, <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>)
FDC	Células dendríticas foliculares (do inglês, <i>Follicular dendritic cells</i>)
FMO	Fluorescência menos uma (do inglês, <i>Fluorescence minus one</i>)
FRC	Célula reticular fibroblástica, (do inglês, <i>Fibroblastic reticular cells</i>)
FRC-DN	FRC duplo-negativo para PDGFR α e CD141
FRC-DP	FRC duplo-positivo para PDGFR α e CD141
HBSS	Solução balanceada de <i>Hank</i> (do inglês, <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HE	Hematoxilina e eosina
HEV	Vênula do endotélio alto (do inglês, <i>High vein endothelial</i>)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, <i>Hepatocyte growth factor</i>)
IDO	Indolamina 2-3 desoxigenase (do inglês, <i>Indoleamine 2, 3-dioxygenase</i>)
IFN	Interferon

IL1Rap	Proteína acessória do receptor de IL1 (do inglês, <i>IL1 Receptor accessory protein</i>)
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
JAM-C	Molécula de adesão juncional (do inglês, <i>Junctional adhesion molecule</i>)
Kb	Kilobase
LEC	Célula endotelial linfática (do inglês, <i>Lymphatic endothelial cell</i>)
LIF	Fator inibidor de leucemia (do inglês, <i>Leukemia inhibitory factor</i>)
LN	Linfonodo ou nódulo linfático (do inglês, <i>Lymph node</i>)
MALT	Tecidos linfóides associado à mucosas (do inglês, <i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
Mc1	Meio de cultura celular
Mc2	Meio de congelamento celular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, <i>Major histocompatibility complex</i>)
MIX	Solução enzimática
MRC	Células reticulares marginais (do inglês, <i>Marginal reticular cells</i>)
NK	<i>Natural-killers</i>
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric oxide</i>)
OLS	Órgãos linfóides secundários
P	Passagem celular
p75NGFR	Receptor do fator de crescimento neural p75 (do inglês, <i>p75 Nerve growth factor receptor</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)
PDGFRα	Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (do inglês, <i>Platelet-derived growth factor receptor</i>)
PD-L	Ligante de morte programada (do inglês, <i>Programmed death-ligand</i>)
PDPN	Podoplanina (do inglês, <i>Podoplanin</i>)
PGE	Prostaglandina E2 (do inglês, <i>Prostaglandin E2</i>)
PTA	Antígenos de tecidos periféricos (do inglês, <i>Peripheral tissues antigens</i>)
SCF	Fator de células-tronco (do inglês, <i>Stem-cell factor</i>)
SCS	Seio subcapsular (do inglês, <i>Subcapsular sinus</i>)
SP	Sangue periférico
TCR	Receptor de célula T (do inglês, <i>T cell receptor</i>)

TGF	Fator de crescimento transformante (do inglês, <i>Transforming growth factor</i>)
TH	Células T auxiliares (do inglês, <i>T helper cells</i>)
TLR	Receptor semelhante ao <i>Toll</i> (do inglês, <i>Toll like receptor</i>)
TLT	Tecidos linfoides terciários
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Fator</i>)
TRCs	FRC da zona de células T
Treg	Células T reguladoras (do inglês, <i>Regulatory T cells</i>)
TTG	Transglutaminase tecidual (do inglês, <i>Tissue transglutaminase</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Fator</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
°C	Grau Célsius
cm	Centímetro
g	Força Centrifuga Relativa
mL	Mililitros
ng	Nanograma

RESUMO

Alvarenga HG. Identificar e isolar células reticulares fibroblásticas em linfonodos humanos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Células reticulares fibroblásticas (FRCs, gp38+ e CD31-) e células duplo negativas (DNCs, gp38- e CD31-) são células estromais encontradas em órgãos linfoides secundários, como linfonodos. Enquanto as FRCs têm sido amplamente estudadas, pouco se sabe ainda sobre DNCs. Apesar da função estrutural das FRCs nos linfonodos já estar bem estabelecida, estudos recentes indicam que as FRCs também desempenham um papel fundamental em processos imunológicos, por exemplo, migração celular, ativação e qualidade da resposta imune, além da participação na tolerância periférica. Outra célula estromal em constante estudo são as células-tronco mesenquimais (CTMs), principalmente encontradas na medula óssea. FRCs e CTMs compartilham similaridades, como por exemplo: são células estromais encontradas em órgãos linfoides, apresentam morfologia e características semelhantes quando cultivadas *in vitro* e têm participação na resposta imune por mecanismos semelhantes. As CTMs são provenientes de um órgão linfóide primário, cuja função principal não está diretamente relacionada à resposta imunológica, entretanto, de acordo com inúmeros trabalhos, estas células possuem capacidade de interferir na ativação de várias células do sistema imunológico. Nossa hipótese é de que as FRCs e DNCs, que se encontram em um órgão linfóide secundário, cuja função principal remete a resposta imunológica, apresentem também um papel regulador, descrito na literatura como tolerância periférica e contração de uma resposta imunológica já estabelecida. Em nosso estudo mostramos que FRCs e DNCs foram isoladas a partir de linfonodos humanos e devidamente caracterizadas. Esclarecemos que FRCs e DNCs atendem todos os critérios mínimos propostos pela sociedade internacional de terapia celular para serem consideradas células-tronco estromais. Além disso, mostramos que FRCs e DNCs influenciam a proliferação *in vitro* de linfócitos alogênicos e a expressão de moléculas de *homing* como CXCR4 e CCR6 por estas células. Portanto, contribuímos de forma inédita para o entendimento funcional das FRCs e DNCs, visto que estudos em humanos envolvendo estas células são escassos.

Descritores: 1.Linfonodos 2.Células sstromais 3.Células estromais mesenquimais 4.Célula reticular fibroblástica

ABSTRACT

Alvarenga HG. Identify and isolate fibroblastic reticular cells in human lymph nodes [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Fibroblastic reticular cells (FRCs, gp38⁺ e CD31⁻) and double-negative cells (DNCs, gp38⁻ e CD31⁻) are stromal cells found in secondary lymphoid organs, such as lymph nodes. While the FRCs have been widely studied, little is known about DNCs. Although the structural function of FRCs in lymph nodes is well established, recent studies indicate that FRCs also play a key role in several immunological processes, beyond their involvement in peripheral tolerance, for example: cell migration and active and differentiation of the immune response. Another stromal cell population under much investigation comprises mesenchymal stem cells (MSCs), mainly found in the bone marrow. These cells share similarities with FRCs and DNCs, for example: they are stromal cells found in lymphoid organs, they develop similar morphology and characteristics when cultured *in vitro* and they participate in the immune response sharing similar mechanisms. MSCs are derived from a primary lymphoid organ which the major function is not directly related to immune response, but numerous studies have shown that these cells can interfere in the activation of various cells of the immune system. Our hypothesis is that FRCs and DNCs, mainly found in secondary lymphoid organs, have immune regulatory roles on the mechanisms determining peripheral tolerance and contraction of the immune response. In our study we show the isolation of FRCs and DNCs from human lymph nodes and their phenotypic characterization. We confirmed that FRCs and DNCs meet all minimum criteria proposed by the International Society of Cell Therapy to be considered as stromal stem cells. Furthermore, we show that FRCs and DNCs influence the *in vitro* proliferation of the allogeneic lymphocytes and the homing molecules expression, such as CXCR4 and CCR6 on these cells. Therefore, we contributed in an unpublished manner to the functional understanding of FRCs and DNCs, since human studies involving these cells are scarce.

Keywords: 1.Lymph nodes 2.Stromal cells 3.Mesenchymal stromal cells 4.Fibroblastic reticular cell

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 Órgãos linfoides secundários	1
1.2 Estrutura e composição celular dos linfonodos	1
1.3 Célula Reticular Fibroblástica	3
1.3.1 Expressão de gp38 como marcador de população de células reticulares fibroblásticas...	4
1.3.2 Diversidade Fenotípica.....	5
1.3.3 Diversidade Funcional.....	9
1.3.3.1 Ativação da resposta imune	9
1.3.3.2 Tolerância periférica.....	12
1.4 Células reticulares fibroblásticas e células-tronco mesenquimais.....	15
1.5 Células-tronco mesenquimais	15
1.5.1 Imunomodulação	16
2 HIPÓTESE GERAL	20
3 JUSTIFICATIVA.....	20
4 OBJETIVOS.....	20
4.1 Geral.....	20
4.2 Específicos	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Características amostral.....	21
5.2 Análise anatomopatológica e histoquímica	21
5.3 Obtenção de células estromais e linfócitos a partir de linfonodos humanos	22
5.4 Cultivo celular	23
5.5 Obtenção de linfócitos alogênicos a partir de sangue periférico	24
5.6 Obtenção, cultivo e caracterização de CTMs.....	24
5.7 Co-cultivo celular de FRCs ou DNCs com linfócitos alogênicos isolados a partir de linfonodos ou de sangue periférico estimulados por PHA	24

5.8 Caracterização imunofenotípica de FRCs, DNCs e linfócitos por citometria de fluxo.....	25
5.9 Separação celular.....	27
5.10 Diferenciação em três linhagens mesodérmicas.....	27
5.10.1 Diferenciação adipogênica	27
5.10.2 Diferenciação osteogênica.....	28
5.10.3 Diferenciação condrogênica	28
5.11 Métodos de coloração histoquímica	29
5.11.1 Oil-red	29
5.11.2 Alizarin-red	29
5.11.3 Toluidene-blue	29
5.12 Análises de FACs	29
5.13 Análise estatística.....	30
6 RESULTADOS.....	30
6.1 A análise anatomopatológica e imunohistoquímica dos linfonodos evidenciou sua morfologia e integridade	30
6.2 Células estromais isoladas de linfonodos humanos assemelharam-se imunofenotipicamente às CTMs	33
6.3 As células estromais isoladas a partir de linfonodos humanos são FRCs e DNCs	34
6.4 Separação das FRCs e DNCs por <i>cell sorting</i>	34
6.5 FRCs e DNCs são capazes de se diferenciar em populações de origem mesodérmica: adipócito, osteócito e condrócito.....	35
6.6 Influência das FRCs e DNCs na proliferação e expressão das moléculas de <i>homing</i> em linfócitos alogênicos (Ensaio funcional)	37
6.6.1 A presença de FRC e DNC diminui a proliferação de linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo.....	37
6.6.2 FRCs e DNCs alteram a expressão das moléculas de <i>homing</i> nos linfócitos alogênicos	38
7 DISCUSSÃO.....	43
8 CONCLUSÃO	48
9 ANEXO	48
9.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FRCs SEGUNDO OS MARCADORES, QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS.....	48
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICES	

INTRODUÇÃO

1.1 Órgãos linfoides secundários

Órgãos linfoides secundários (OLS) são responsáveis por favorecer as interações celulares necessárias para o início da resposta imunológica. Os OLS compreendem o baço, os linfonodos (do inglês *Lymph Node*, LN) e os tecidos linfoides associados as mucosas digestiva, respiratória e urinária (MALT), como as placas de *Peyer* e as tonsilas. Tecidos linfoides terciários (TLT), são sítios anatômicos que, em circunstâncias normais, contêm poucos linfócitos, mas quando estimulados podem ser tomados por estas células, embora apresentem características e organização celular diferente a dos OLS. O LN é o órgão que recebe fluidos extracelulares (linfa ou líquido linfático) através dos vasos linfáticos que drenam todos os tecidos e órgãos do organismo. O LN é envolto por uma cápsula de revestimento formado por tecido conjuntivo e abaixo dela está localizado o seio subcapsular (do inglês *Sinus Subcapsular*, SCS) onde os vasos linfáticos terminam trazendo a linfa. Esta transporta moléculas, antígenos, microrganismos, linfócitos e células apresentadoras de antígeno (do inglês *Antigen-presenting cell*, APCs) dos tecidos, órgãos e/ou de outros LNs.

Os LNs exercem três funções principais. A primeira delas é a captação de moléculas, debris celulares e microorganismos, por exemplo, células dendríticas (do inglês *Dendritic Cells*, DCs) no LN fagocitam potenciais patógenos e produzem mediadores imunes inatos como o interferon (IFN) do tipo I, outras citocinas e radicais derivados do oxigênio e nitrogênio e ativam a imunidade inata. Estes mecanismos de resposta imune rápida reduzem o número de patógenos enquanto a resposta imune adaptativa se desenvolve. A segunda função dos LNs é proporcionar o encontro entre as DCs que estão apresentando determinados antígenos e os respectivos linfócitos antígeno-específicos. Por último, nos LNs são produzidos fatores de sobrevivência e de diferenciação de linfócitos (Junt *et al*, 2008). Os LNs têm uma estrutura de sustentação de fibras, principalmente de colágenos, que se dispõem em trabéculas ou malha solta sobre a qual se dispõe e movimentam as células.

1.2 Estrutura e composição celular dos linfonodos

Há nos LNs além das células do sistema imune, uma variedade de células estromais. Estas células estão distribuídas em diferentes regiões e são capazes de criar

ambientes especializados para responder aos desafios antigênicos em diferentes momentos da reposta imune.

O LN pode ser dividido em três regiões. Região cortical, que inclui o SCS – onde estão principalmente localizadas as DCs, o seio peritrabecular e os folículos linfoides, também conhecidos como zona de predominância de linfócitos B. Nos folículos são encontradas as células dendríticas foliculares (do inglês *Follicular Dendritic Cells*, FDCs) que constituem uma população de DCs com características próprias. Região paracortical, com grande densidade de linfócitos e predominância de linfócitos T situa-se ao lados dos folículos. Região medular, onde os linfócitos e plasmócitos formam os cordões medulares, observa-se os seios medulares linfáticos e encontram-se presentes os vasos linfático e sanguíneo (**Figura 1**).

Na zona de células B, além dos linfócitos B e de algumas células T, estão presentes as FDCs, as quais produzem a quimiocina CXCL13, que atrai para os folículos os linfócitos B que expressam CXCR5. Além disso, as FDCs podem estar envolvidas na homeostase, ativação e diferenciação de linfócitos B (Muller e Germain, 2009).

Na região paracortical, se localiza a zona de predomínio de células T que é rica em APCs. Na zona de células T, além das APCs e linfócitos T, encontramos as células reticulares fibroblásticas (do inglês *Fibroblastic Reticular Cells*, FRCs), as quais formam canais condutores que se estendem por toda a zona de células T, desde o SCS até as vênulas do endotélio alto (do inglês *High Endotelial Venule*, HEV). Os canais condutores apresentam uma porção exterior formada pelas FRCs, e uma porção interna onde se encontram as fibras de colágeno e proteínas da matriz extracelular, as quais são produzidas pelas FRCs (Junt *et al*, 2008). Este canal é capaz de transportar proteínas de baixo peso molecular em seu interior (Crivellato e Mallardi, 1997; Junt *et al*, 2008). As FRCs também regulam a migração e a sobrevivência de células T, por meio da produção de CCL19, CCL21 e IL7. Células T virgens e DC maduras que expressam CCR7 são atraídas pelas quimiocinas CCL19 e CCL21 contribuindo para a delimitação da zona de células T (Junt *et al*, 2008).

Entre o SCS e a zona de células B, são encontradas as células reticulares marginais (do inglês *Marginal Reticular Cells*, MRC), que também formam uma rede capaz de entregar antígenos a partir do SCS para os linfócitos B foliculares, participando da captura e distribuição de antígenos. Além de estruturar um canal funcional, as MRCs também são capazes de secretar citocinas (Muller e Germain, 2009).

As células endoteliais também fazem parte deste microambiente, e podem ser identificadas como células endoteliais linfáticas (do inglês *Lymphatic Endothelial Cell*, LEC) e as células endoteliais sanguíneas (do inglês *Blood Endothelial Cell*, BEC) (Muller e Germain, 2009). As LECs estão presentes no interior dos vasos linfáticos e as BECs são encontradas no interior de vasos sanguíneos. Ambos os tipos celulares são indispensáveis para a constante recirculação de linfócitos em SLOs (Junt *et al*, 2008; Luther *et al*, 2011).

A disposição celular encontrada no LN é favorável à resposta imune. Antígenos livres ou APCs, após a fagocitose de antígenos, são carregados e/ou migram aos LNs pelos vasos linfáticos. A linfa chega ao LN pelo vaso aferente e é liberada na região cortical. Ao entrar no LN, a linfa se espalha pelo SCS e atinge a zona de células B e T, onde os antígenos livres são capturados por APCs residentes e ocorre o encontro dos linfócitos e das APCs que apresentam antígeno-específico (Junt *et al*, 2008). Já os linfócitos oriundos do sangue periférico (SP) entram no interior do LN passando pelas HEV na região medular (Muller e Germain, 2009). A migração celular e o tempo em que os linfócitos permanecem no LN são determinados por moléculas responsáveis pela retenção destas células no órgão e por quimiocinas produzidas principalmente por FRC e FDC, formando microambientes adequados e proporcionando, de forma homeostática, a ativação e a diferenciação de células essenciais para a resposta imune.

Figura 1. Estrutura do linfonodo. Representação esquemática dos principais componentes estruturais do linfonodo.

1.3 Célula Reticular Fibroblástica

Apesar da função estrutural das FRCs nos LNs já estar bem estabelecida, estudos recentes indicam que as FRCs também desempenham um papel fundamental em

processos imunológicos, por exemplo, migração celular, ativação e qualidade da resposta imune, além da participação na tolerância periférica (Sobocinski, 2010; Siegert *et al*, 2011; Onder *et al*, 2012). Múltiplas funções e uma variedade de características imunofenóticas das FRCs são descritas. Porém, uma associação clara entre função e fenótipo não foi ainda relatada. Marcadores clássicos, como a expressão de gp38 e ausência de CD31 são bem descritos em camundongos; no entanto, vários outros marcadores foram descritos para as FRCs nos últimos anos tanto em camundongos como em humanos, permitindo classificá-las em diversos subtipos.

1.3.1 Expressão de gp38 como marcador de população de células reticulares fibroblásticas

Podoplanina (PDPN) é uma proteína transmembrana do tipo mucina (Astarita *et al*, 2012; Wicki e Christofori, 2006) cujas funções incluem a participação no desenvolvimento de alguns órgãos, motilidade celular, tumorigênese e metástase. A síntese desta proteína é controlada pelo gene PDPN, constituído por 34,2 kilobases (Kb) e 8 éxons (Raica *et al*, 2008). PDPN é o nome comumente utilizado, porém vários grupos, em momentos distintos, descreveram genes ortólogos ou idênticos como: TI α , hTI α -2, randam-2, E11, OTS8, Aggrus, gp36 (Vanderbilt *et al*, 2008), gp38 (Farr *et al*, 1992), gp40 (Zimmer *et al*, 1997), PA2.26 (Gandarillas *et al*, 1997), RTI40 (Gonzalez e Dobbs, 1998) e nesse trabalho utilizaremos a nomenclatura de gp38. Este gene foi descrito por diversos autores como sendo expresso em FRCs (revisado em Alvarenga e Marti, 2014).

A presença de gp38 em FRC foi inicialmente descrita por Farr *et al* em 1992. Desde então, diversos estudos adotaram a gp38 para a classificação e identificação das FRCs em conjunto com a exclusão de CD31, auxiliando na distinção das FRCs de outros tipos celulares que expressam o gp38, como as LECs.

A participação da gp38 no desenvolvimento de órgãos pode ser variável. Nos rins, a gp38 é expressa em células epiteliais do glomérulo, conhecidas como podócitos, e parece ser essencial para a filtração glomerular (Ijelaar *et al*, 2008; Navarro-Núñez *et al*, 2013). No sistema nervoso central a gp38 é necessária para a formação correta do plexo coroide e é altamente expressa em tumores cerebrais (Astarita *et al*, 2012; Navarro-Núñez *et al*, 2013).

No coração, a gp38 é necessária para o desenvolvimento normal, especialmente na transição epitélio-mesenquima (do inglês, *Epithelial-mesenchymal Transition*, EMT).

A gp38 também participa no desenvolvimento pulmonar e maturação efetiva das células epiteliais alveolares do tipo I. No intestino não há ainda uma função específica determinada, porém a gp38 é expressa na lamina própria. Em órgãos linfoides, é necessária para a formação e organização adequada, principalmente na arquitetura vascular linfática e indução da migração de DC nos LNs. Além disso, a gp38 está altamente expressa no estroma de OLS e em tecidos linfoides ectópicos (Astarita *et al*, 2012).

Nos OLS está bem estabelecida a expressão da gp38 nas LECs, FRCs e FDC. A expressão da gp38 também foi descrita em células T auxiliares 17 (do inglês *T helper*, Th) que são as células com grande potencial inflamatório, mas também atuam na formação de centros germinativos (Astarita *et al*, 2012; Navarro-Núñez *et al*, 2013). Há expressão de gp38 em subtipos de macrófagos, além dessa proteína também participar de mecanismos de agregação plaquetária (Astarita *et al*, 2012).

O ligante da gp38 é o receptor de lecitina do tipo C (CLEC-2), expresso principalmente em plaquetas e DCs, mas também pode estar presente em neutrófilos, células T, macrófagos (Astarita *et al*, 2012), monócitos, células *natural-killer* (NK) (Navarro-Núñez *et al*, 2013) e linfócitos B (Acton *et al*, 2012; Navarro-Núñez *et al*, 2013). Nas DCs, a ligação gp38/CLEC-2, promove a motilidade das DCs, que saem dos sítios periféricos e migram até a zona de células T no LN (Astarita *et al*, 2012). Em células mielóides, a sinalização de CLEC-2 pelo seu ligante parece aumentar a produção de IL10, sugerindo sua participação no término da inflamação (Navarro-Núñez *et al*, 2013).

Em câncer, a gp38 tem sido amplamente estudada e a sua expressão foi correlacionada com o aumento da linfangiogênese, a presença de metástase e consequentemente com o mau prognóstico. Esta molécula pode estar super expressa em vários tipos tumorais e parece aumentar a atividade das Rho GTPases. Entretanto, o mecanismo exato da sua ação não está completamente elucidado (Astarita *et al*, 2012, Raica *et al*, 2008; Navarro-Núñez *et al*, 2013; Wicki e Christofori, 2006).

1.3.2 Diversidade Fenotípica

No LN as FRC podem ser fusiformes, estreladas ou altamente alongadas dependendo da sua localização (Clark, 1962). Estas células são encontradas nas regiões cortical e medular do LN e podem estar em contato umas com as outras e com vários outros tipos celulares, como, linfócitos, linfoblastos, plasmócitos, DC interdigitantes e

foliculares (Clark, 1962; Crivellato e Mallardi, 1997). Além da variação morfológica, as FRC podem apresentar características fenotípicas distintas de acordo com a posição que ocupam neste órgão (Crivellato e Mallardi, 1997).

Link e colaboradores e colaboradores (2007) descreveram quatro subtipos de FRCs em LNs de roedores, segundo sua localização: as FRC presentes na zona de células T (TRCs), próximas aos canais condutores e envolta a esses canais, FRCs forrando o SCS e FRCs próximas aos vasos sanguíneos (pericitos). Adicionalmente, existe ainda outro subtipo de FRC localizado logo abaixo da cápsula do LN, as MRCs. Diferente das FRCs, as MRCs expressam CXCL13, MAdCAM-1 e altos níveis de RANK-L (Mueller e Germain, 2009; Luther *et al*, 2011; Hess *et al*, 2012) (**Figura 2**).

Figura 2. Homeostase celular do linfonodo e subtipos de FRCs segundo sua localização: FRC próximas ao seio subcapsular (MRC), FRCs forrando o SCS, FRCs próximas aos vasos sanguíneos (pericitos) e FRC próximas e envolta aos canais condutores na zona de células T (TRC).

Em áreas corticais, as FRCs estão associadas ao SCS, de acordo com o seu papel funcional nesta região. As FRCs corticais são polarizadas, apresentando um polo receptivo que recolhe moléculas solúveis (antígenos, citocinas, neuropeptídios, lipídeos, produtos microbianos) do lúmen do SCS e um polo de entrega que fica em contato com linfócitos e outras células não linfóides ao longo das HEVs localizadas no parênquima cortical (Anderson e Shaw, 1993; Crivellato e Mallardi, 1997).

Somente a expressão da gp38 não é suficiente para identificar as FRC murinas, pois este marcador também é expresso por FDCs e LECs. LECs são diferenciadas pela expressão de CD21, CD31 e LYVE-1; já as FDCs se diferem das FRCs pela sua localização e expressão de CD21, CD35, C4 (FDC-M2) e BP-3, Mfge8 (FDC-M1), CD16, CD23, CD32. Porém, as FRCs e FDCs podem se assemelhar na expressão dos marcadores, CD54, CD106 e CD157 (Link *et al*, 2011; Luther *et al*, 2011; Sierget *et al*, 2011; Mueller e Germain, 2009).

A identificação das FRCs murinas é feita com base em um conjunto de marcadores, alguns expressos por estas células e outros que auxiliam na exclusão de outros tipos celulares. FRCs murinas são classicamente caracterizadas pela expressão de gp38 e ausência de CD31, bem como pela secreção das quimiocinas CCL19, CCL21 e da citocina IL7. Porém, na última década vários estudos identificaram marcadores adicionais para estas células presentes em LNs de diferentes espécies (**Anexo 1**).

Além dos subtipos de FRC classificados segundo sua localização, outros dois marcadores capazes de subclassificar as FRCs foram descritos em primatas, o receptor do fator de crescimento neural p75 (do inglês *Nerve Growth Factor Receptor*, p75NGFR) e a transglutaminase tecidual (do inglês *Tissue Transglutaminase*, TTG). FRCs são positivas para p75NGFR, um membro da família do receptor de fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Fator*, TNF), e todas as subpopulações de FRCs descritas segundo sua localização são positivas para TTG, uma enzima envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, como apoptose de linfócitos e outros tipos celulares, e ativação de citocinas pró-inflamatórias (Steele *et al*, 2009). Embora a expressão TTG represente um marcador de subtipos de FRCs classificados segundo sua localização, a expressão de p75NGFR não foi reportada em um subtipo específico.

Thomazy *et al* (2003) utilizaram a identificação da expressão de TTG em FRCs, que previamente havia sido descrita como FRCs capazes de induzir a produção de citocinas e retinóides, para evidenciar mudanças no estado da rede reticular de LNs

normais em comparação aos neoplásicos. Existem algumas condições em que a rede de FRC fica aberta, permitindo a alta circulação de células e solutos ao redor do folículo, sendo este estado correlacionado com o pico de reações no centro germinativo e aumento da expressão de TTG. Em outras situações esta rede fica fechada limitando a migração de células do SCS, e a expressão de TTG permanece restrita às células do SCS. O padrão de TTG encontrado no estroma de diferentes tipos de linfoma sugere que ocorre alteração destes padrões dinâmicos na maioria dos tipos tumorais.

Frontera *et al* (2011) descreveram que as FRCs expressam a molécula de adesão juncional (do inglês *Junctional Adhesion Molecule*, JAM-C), receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (do inglês *Platelet-derived Growth Factor Receptor*, PDGFR α) e trombomodulina (CD141). A expressão destas moléculas pode subdividir as FRCs em três subtipos com distinta capacidade secretória das quimiocinas CCL19, CCL21 e do fator de célula estromal (do inglês *stromal cell-derived fator*, SDF)/CXCL12: uma subpopulação mais escassa de células que expressa níveis intermediários de PDGFR α e CD141, e dois subtipos com maior número de célula denominada FRC duplo-negativo (FRC-DN) ou FRC duplo-positivo (FRC-DP) para ambos os marcadores. A expressão de JAM-C é restrita às FRCs-DP e está associada à secreção das quimiocinas CCL19, CCL21 e CXCL12. Desta forma, um papel funcional diferenciado pode ser atribuído ao subtipo FRC-DP, devido à associação descrita da expressão de JAM-C com maior produção de quimiocinas e a consequente retenção de linfócitos nos LN.

Apesar do progresso rápido nos últimos anos, a caracterização das FRCs encontra-se incompleta, e ainda não há um consenso sobre os marcadores adequados para sua subclassificação. Também não está bem esclarecido se as diferentes subpopulações de FRC podem ser agrupadas pela expressão comum dos vários marcadores utilizados ou se a expressão diferencial pode ser devida ao estado de ativação ou à sua localização no LN. Ainda não existe, portanto, uma conclusão de quais marcadores são capazes de diferenciá-las de acordo com uma função distinta. Diante da diversidade de fenótipos em murinos e humanos, a definição das subpopulações de FRCs permitiria avaliar a existência de funções exclusivas ou compartilhadas por células com morfologias e padrões de expressão distintos. Estudos futuros poderão esclarecer estas relações, bem como a possível variação entre diversas espécies.

1.3.3 Diversidade Funcional

Embora consideradas originalmente como células de suporte no LN, nas últimas décadas tem-se proposto que as FRCs possam ter funções adicionais (Tykocinski *et al*, 1983), como por exemplo, suporte para migração e sobrevivência de linfócitos, possível participação na ativação e controle da resposta imune ou na tolerância periférica (Fletcher *et al* (b), 2011), entretanto, trabalhos mais aprofundados serão necessários para estabelecer a abrangência destes achados. Além disso, ainda não há consenso sobre a correspondência fenotípica e funcional das subpopulações destas células. Porém a investigação de um possível papel imunomodulador é de grande interesse, devido à possível influência sobre a regulação da resposta imune e estabelecimento da tolerância periférica.

1.3.3.1 Ativação da resposta imune

O envolvimento com o sistema imunológico faz das FRCs células de grande importância na resposta imune em curso (Hara *et al*, 2006). A rede reticular formada pelas FRCs pode ser favorável à resposta imune adaptativa de várias formas, pode funcionar como uma base física para reações imunológicas *in vivo*, onde as FRCs promovem simultaneamente força mecânica para o tecido e fornece espaço para a migração das células do sistema imune, e também atuam como barreira física para a compartimentalização do LN, prevenindo uma interação desordenada ou crescimento descontrolado (Hara *et al*, 2006; Katakai *et al*, 2004). Além disso, pequenos antígenos podem ser drenados pelos canais condutores formados pelas FRCs, tanto para a zona de células T, quanto para a zona de células B levando a captura de antígenos pelas células B e DCs residentes (Luther *et al*, 2011). Moléculas de alto peso molecular são incapazes de entrar no lúmen dos canais formados pelas FRCs e permanecem retidas em macrófagos próximos ao SCS. A exclusão das grandes moléculas pode se restringir ao tipo de sinal emitido pelos canais condutores, evitando assim o acesso de alguns agentes patogênicos (Mueller e Germain, 2009).

Classicamente as FRCs murinas são conhecidas por secretar CCL19, CCL21 e IL7, embora estudos mais recentes relatem a produção de outras citocinas envolvidas na homeostase e sobrevivência de linfócitos, como IL6 e IL15 (Katakai *et al*, 2004; Hara *et al*, 2006; Luther *et al*, 2011; Steele *et al*, 2009; Link *et al*, 2007). Algumas quimiocinas podem ser constantemente expressas pelas FRCs, outras podem ser expressas em baixos

níveis quando em estado de repouso e aumentam essa expressão em resposta a estímulos, como TNF α . Outras ainda são expressas apenas após o estímulo inflamatório, como TNF α , IFN γ , IL1 ou lipopolissacarídeo (LPS) (**Anexo 1**).

As quimiocinas CCL19 e CCL21 produzidas pelas FRCs favorecerem a resposta imune co-estimulando a ativação de células T, aumentando a interação entre células T e DCs, promovendo a maturação das DCs, estimulando endocitose e apresentação de antígeno pelas DCs, além de promover a extensão de dendritos em DCs maduras (Mueller e Ahmed, 2008; Mueller e Germain, 2009). DCs ativadas produzem as quimiocinas CCL3 e CCL4, as quais recrutam células T (antígeno-específicas raras) que migram de forma direcionada pelas FRCs. Portanto, a interação de FRCs, DCs e quimiocinas ajuda a primar a resposta imune (Mueller e Germain, 2009). Vale ressaltar que as FRCs podem regular positivamente não só a migração e a homeostase das células T, como também há indícios de que elas influenciem o início da diferenciação de células T efectoras e de memória (Siegert e Luther, 2012).

A IL7 é um fator de sobrevivência que atua nas células T *naive* e auxilia a manutenção do repertório e imunocompetência. As TRCs murinas isoladas de LNs apresentam a expressão gênica dez vezes maior das quimiocinas CCL19 e CCL21 quando comparada às BECs e células estromais duplo negativas (DNC, gp38-CD31-) e dez vezes mais IL7 que outro tipo celular presente no LN (Link *et al*, 2007). Além dos efeitos sobre os linfócitos T e B, evidências recentes indicam que a IL7 pode ter um impacto sobre o desenvolvimento das DC e células *natural-killers* T (NKT) (Onder *et al*, 2012). A IL7 também pode contar com a ação aditiva das quimiocinas na indução da sobrevivência celular. Tanto a quimiocina CCL19 quanto CCL21 são capazes de aumentar a sobrevivência de células T *naive*, embora a CCL19 tenha se mostrado mais potente que a CCL21. Estes dados sugerem que a secreção de IL7 e CCL19 é suficiente para a manutenção da sobrevivência de células T (Link *et al*, 2007). Porém não se sabe ainda se tais efeitos sobre a sobrevivência celular são compartilhados por outras citocinas. Estes dados sugerem que a indução da sobrevivência celular pela FRC não é devido a único fator, via ou mecanismo de ação. Ressaltando um papel funcional para FRCs que vai além de suporte estrutural.

Durante a resposta imunológica, um número significativo de linfócitos são primados e expandidos. Com a eliminação progressiva dos antígenos, são ativados mecanismos que levam à redução drástica do número de linfócitos efetores (contração da

resposta imune). A morte celular antígeno-induzida é um dos mecanismos que faz com que o número de linfócitos volte aos níveis próximos da pré-ativação, e então alguns dos linfócitos que sobrevivem se diferenciam em linfócitos de memória. As quimiocinas CCL19 e CCL21 também podem promover morte celular antígeno-induzida em células T ativadas, sugerindo que a diminuição destas quimiocinas nos tecidos linfoides contribua com estágios tardios da resposta imune. É também interessante pensar que o estímulo constante ou altas doses de CCL19 e CCL21 talvez inibam a ativação, proliferação ou função das células T (Muller e Ahmed, 2008).

Em condições homeostáticas, a FRC encontrada na zona de células T e nos cordões medulares é o principal tipo celular estromal que expressa o fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) nos LNs. O VEGF apresenta um papel central na manutenção e proliferação de células endoteliais vasculares, incluindo HEVs (Chyou *et al*, 2008; Mueller e Germain, 2009).

LNs mesentéricos e drenantes de pele parecem apresentar uma composição estromal distinta. Embora a quantidade de BECs, LECs, DNC e MRCs seja semelhante em ambos os locais, as TRCs parecem estar presentes em maior proporção com perfil diferenciado nos LNs drenantes de pele. Nos LNs mesentéricos, as FRCs apresentam redução significativa na expressão de várias citocinas e quimiocinas importantes, como, IL6, IL7, CXCL9, CXCL10, IL1 receptor proteína acessória (IL1Rap), receptor de activina IIA, VEGF-A, LIF e c-KIT-ligante. Já nos LNs drenantes da pele, as FRCs expressaram altos níveis de IL1R1 e de IL1Rap, mas não expressam o análogo IL1RN. Também foi previamente descrito que FRCs respondem ao receptor semelhante ao *Toll* 3 (do inglês *Toll-like Receptor*, TLR), sugerindo que estas células reajam rapidamente à infecção (Fletcher *et al* (b), 2011). Somente células do estroma de LNs mesentéricos apresentam expressão do ácido retinóico metabólito da vitamina A. Células T ativadas neste ambiente estromal apresentam um fenótipo de migração (do inglês, *homing*) para o tecido intestinal expressando $\alpha 4\beta 7$ e CCR9. Células do estroma de LNs mesentéricos induzem respostas de IgA consistentes. Estes dados também indicam que o estroma pode dirigir o tipo e a qualidade das respostas imunes em OLSs (Mueller e Germain, 2009).

Em conjunto, estes dados sugerem que as FRCs podem contribuir com a resposta imune através da regulação da migração celular nos LNs, indução da sobrevivência linfocitária, qualidade da apresentação de antígenos e de um possível direcionamento da resposta imune. Dada a possível variedade de funções associada às FRCs, novos estudos

que explorem a heterogeneidade funcional destas, ou de subpopulações específicas, permitirão o correto dimensionamento da relevância destas células na regulação de processos imunes.

1.3.3.2 Tolerância periférica

Algumas células do estroma expressam vários antígenos de tecidos periféricos (do inglês *Peripheral Tissues Antigens*, PTA) e estão envolvidas na manutenção da tolerância periférica, principalmente através da deleção de células T auto-reativas (Turley *et al*, 2010; Fletcher *et al* (b), 2011; Lukacs-Kornek *et al*, 2011; Siegert e Luther, 2012). Em OLS, os antígenos podem ser apresentados às células T pelas células provenientes do sangue (como linfócitos B), ou por células da linfa (como DC) e ainda por células residentes (como DC residentes) (Turley *et al*, 2010).

A expressão do gene regulador de autoimunidade (do inglês *Autoimmune Regulator Gene*, AIRE) em FRCs ainda é controversa. Enquanto alguns estudos relatam a expressão de AIRE em células estromais, mas não especificamente em FRCs (Mueller, Germain 2009; Turley *et al*, 2010; Fletcher *et al* (b), 2011; Luther *et al*, 2011; Hess *et al*, 2012; Malhota *et al*, 2012), Siegert *et al* (2012), relataram que AIRE pode ser expresso em baixos níveis em FRCs. Segundo Turley *et al* (2010), embora o gene AIRE seja expresso em algumas células estromais do LN, este parece não controlar a expressão de PTAs em FRCs e LECs. No entanto, FRCs e LECs expressam o DEAF1, um fator de transcrição regulado pelo gene DF1 que controla a expressão de aproximadamente 300 genes em LNs pancreáticos, dos quais 75% são classificados como PTAs. Apesar de AIRE e DEAF1 serem similares, apresentam mecanismos diferentes ao controlar a expressão de PTAs (Turley *et al*, 2010). Em camundongos NOD existem pelo menos duas isoformas de DF1, o DF1 canônico e o DF1 variante proveniente de um *splicing* alternativo (do inglês *Alternatively Spliced Variant in DF1*, DF1-VAR1). O DF1 canônico é capaz de se translocar para o núcleo e regular a transcrição de PTAs, já o DF1-VAR1 é expresso no citoplasma e pode se ligar ao DF1 canônico sequestrando este para o citoplasma, desta forma inibindo a transcrição dos PTAs (Fletcher *et al* (b), 2011; Yip *et al*, 2009).

As FRCs podem induzir tolerância nas células T através da expressão de antígenos próprios ou limitar a resposta de células T aos antígenos não próprios através da expressão de fatores supressivos. As FRCs podem inibir a expansão de células T de forma direta ou

de forma indireta pela redução da imunogenicidade de DCs (Siegert e Luther, 2012). Ao contrário das APCs clássicas, a estimulação de TLR em células do estroma induz um fenótipo mais tolerogênico que imunogênico, sendo possível que isto proteja a estrutura dos LNs contra danos auto-reativos durante a ativação de células T. A atividade tolerogênica de células estromais pode ocorrer mesmo na ausência de APCs (Turley *et al*, 2010).

Além da participação da FRCs na tolerância periférica através da expressão de PTAs, as FRCs são altamente responsivas ao IFN γ produzido por células T e respondem com o aumento na transcrição do gene NOS2, codificando a enzima óxido nítrico sintase induzível (do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS). A enzima iNOS participa da produção de nitrito, o qual é capaz de bloquear a progressão do ciclo celular das células T. Estas observações colocam as FRCs como reguladoras da ativação de células T através do contato direto com células T produtoras de IFN- γ (Sierget *et al* 2011). TNF- α apresenta uma ação sinérgica ao IFN- γ na indução da síntese de iNOS (Siegert e Luther, 2012). É provável que células Th2 sejam insensíveis ao efeito antiproliferativo das FRCs por não produzirem IFN- γ . Este é um possível mecanismo de manutenção da integridade do tecido linfóide, dada a capacidade da resposta Th1 em danificar mais o tecido quando comparada à resposta Th2. O efeito inibitório induzido em células T pelas FRCs ocorre em aproximadamente 24 horas, prazo este que correspondente ao tempo necessário para a produção inicial de IFN- γ em células T (Khan *et al*, 2011).

A produção de óxido nítrico (do inglês *Nitric Oxide*, NO) por FRCs e LECs é fortemente regulada e requer um segundo sinal fornecido pelo TNF- α e pelo contato direto com as células T ativadas. Este processo não afeta a ativação precoce das células T (Lukacs-Kornek *et al*, 2011). O efeito inibitório das FRCs pode afetar tanto células T CD8+ quanto células T CD4+ (Sierget *et al*, 2011). O NO pode regular negativamente as células T através da nitrosilação de diversos resíduos de aminoácidos levando à diminuição do complexo receptor de célula T (do inglês *T Cell Receptor*, TCR). A depleção, pela enzima iNOS, do seu substrato L-arginina disponível, poderia inibir as células T através da diminuição de expressão do CD3 ζ . O NO também pode bloquear diretamente a fosforilação da proteína STAT5 interferindo assim na sinalização da via da IL2 (Siegert e Luther, 2012). Dentre os muitos efeitos do NO, esta molécula pode diferenciar células T CD4+ ativadas em células T reguladoras (do inglês *Regulatory T Cells*, Treg) Foxp3+, que são capazes de suprimir células T CD8+ via IL10. Embora tenha

sido descrito que FRCs podem se assemelhar às células Tregs em diferentes condições, nos experimentos realizados por Lukacs-Kornec *et al* (2011), as células Tregs Foxp3+ e a citocina IL10 foram dispensáveis para o efeito inibitório das FRCs.

O IFN γ se destaca como um importante regulador funcional das FRCs, por sua capacidade de induzir iNOS, indolamina 2-3 desoxigenase (do inglês, *Indoleamine 2, 3-dioxygenase*, IDO) 1, ligante de morte programada (do inglês, *Programmed death-ligand*, PD-L) 1 e várias moléculas envolvidas na apresentação de antígenos. Usualmente IFN γ é a principal citocina pró-inflamatória, por atuar em vários aspectos da resposta imune como na ativação de macrófagos, na depleção de patógenos intracelulares e aumento da expressão das moléculas de MHC. Entretanto, o IFN γ também pode atuar em funções imuno-reguladoras, modulando negativamente a expressão de enzimas proteolíticas, diminuindo o recrutamento de células inflamatórias tais como neutrófilos, inibindo a diferenciação em Th17, além de regular positivamente a diferenciação de células Tregs em certas circunstâncias. Assim como o IFN γ , outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL1- β e o TNF- α produzidas pelas DC ativadas também levam à indução de iNOS nas FRCs (Siegert e Luther, 2012).

Sierget *et al* (2011) sugerem que o papel inibitório das FRCs se dê pela ação de no mínimo três moléculas a iNOS e a ciclooxigenase (do inglês, *Cyclooxygenase*, COX) 1 e 2. A COX-2 é a enzima limitante da velocidade da geração de prostanoídes, incluindo a prostaglandina E2 (PGE2), que pode tanto aumentar quanto suprimir a imunidade de células T (Siegert e Luther, 2012). FRCs iNOS^{-/-} não apresentam nenhuma atividade supressora, aumentando a proliferação de células T. Além disso, a inibição da COX-1 e 2 também é capaz de reduzir o efeito supressivo das FRCs (Sierget *et al*, 2011). Sierget e Luther (2012) propõem que as FRCs sejam estimuladas por citocinas ao produzir NO temporariamente inibindo a proliferação de células T. Esse grupo também propõe um modelo em que as FRCs se comuniquem de forma bidirecional tanto com linfócitos quanto com DC para aumentar a eficiência da resposta imune; entretanto, durante a resposta aguda, as FRCs limitariam a proliferação e atividade inflamatória das células T.

O efeito da FRC na imunidade de células T também tem sido relacionado com a expressão de PD-L1, levando a modulação da resposta de células T CD8+ (Sierget *et al* 2011). PD-L1 e IDO desempenham papéis importantes no desenvolvimento de células Tregs e células supressoras mielóides, podendo conectar as FRCs com a produção, manutenção ou ativação destas células reguladoras (Siegert e Luther, 2012). Muitos tipos

celulares do sistema imunológico têm subtipos que suprimem ou regulam a imunidade adaptativa, como as células T e B reguladoras, DC reguladoras e macrófagos M2 ativados. Por isso, não é surpreendente que as FRCs sejam reguladoras positivas e negativas da imunidade adaptativa (**Figura 3**). Neste contexto, as células estruturais podem agir como sensores mecânicos e químicos da resposta de células T em curso em um órgão inflamado e ajustar a dinâmica das populações para assegurar o crescimento ordenado do tecido e a manutenção das estruturas funcionais (Siegert e Luther, 2012).

Figura 3. Principais mecanismos de ação das FRCs na ativação da resposta imune e na tolerância periférica.

1.4 Células reticulares fibroblásticas e células-tronco mesenquimais

Além das FRC, outro tipo celular estromal muito estudado são as células-tronco mesenquimais (CTM). Ambas as células são estromais encontradas em órgãos linfoides; a CTM compõe o estroma da medula óssea - um órgão linfóide primário, já a FRC colabora na formação do estroma do baço e linfonodo, que são órgãos linfoides secundários. Tanto as CTMs quanto as FRC apresentam morfologia fibroblástica e são aderentes ao plástico. Embora os relatos sejam isolados, a literatura descreve características semelhantes nessas células. Entretanto, estudos com descrição comparativa ou experimentos que avaliem estas semelhanças ainda não foram realizados.

1.5 Células-tronco mesenquimais

CTMs foram inicialmente descritas no início da década de 70 por Friedenstein como células estromais que compõe a medula óssea. Porém estas células podem estar distribuídas em diversos outros tecidos, como, músculo, gordura, folículos capilares, polpa de dente, placenta, derme, pericôndrio, cartilagem articular, cordão umbilical,

pulmão, fígado, intestino, líquido amniótico, membrana sinovial e mama (Gebler *et al*, 2012; Huang *et al*, 2011; Keating, 2012; Nery, 2013).

CTMs são geradas no folheto germinativo intermediário dos tecidos embrionários, esta origem é chamada mesodérmica (Huang *et al*, 2011; Murray *et al* 2013; Slukvin e Vodyanik, 2011; Ucelli *et al*, 2008). CTMs são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto renovação e de diferenciação em células de origem mesodérmica como: células do tecido ósseo (osteócitos), células do tecido adiposo (adipócitos) e células do tecido cartilaginoso (condrócitos) (Bieback *et al*, 2012; Gebler *et al*, 2012; Huang *et al*, 2011; Keating, 2012). São descritos vários marcadores para as CTMs, ou seja, essas células devem apresentar expressão positivas para CD9, CD29, CD44, CD54, CD61, CD63, CD71, CD90, CD97, CD98, CD99, CD105, CD106, CD146, CD155, CD166, CD276 e CD304, e negativa para CD14, CD34, CD45 e CD133 (Nery *et al*, 2013).

Embora as CTMs possam variar quanto à expressão de seus marcadores, perfil de expressão gênica e propriedades funcionais, a Sociedade de Terapia Celular Internacional (ISCT) sugeriu critérios mínimos para a caracterização destas células que incluem: aderência ao plástico, expressão de CD105, CD73 e CD90, e não expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, CD31 e HLA-DR, além da capacidade de diferenciação nas três linhagens mesodérmicas clássicas: condrócitos, adipócitos e osteócitos (Dominici *et al*, 2006).

Muita importância tem-se dado às CTMs devido aos seus efeitos terapêuticos reportados em alguns estudos. Grande parte destes artigos referem-se ao potencial imunomodulador ou pró-regenerativo destas células e estes resultados levaram à intensificação de estudos das CTM em contextos terapêuticos (Bieback *et al*, 2012).

1.5.1 Imunomodulação

As propriedades imunomodulatórias das CTMs tem sido foco de uma variedade de estudos que demonstram efeito terapêutico em modelos animais experimentais de diversas doenças inflamatórias e autoimunes. Porém os mecanismos exatos de como as CTMs regulam o sistema imunológico ainda não estão completamente compreendidos. Sabe-se que as CTMs são capazes de interagir com muitos tipos celulares do sistema imune, tanto com células relacionadas com a imunidade inata quanto com células relacionadas com a imunidade adaptativa. Elas podem inibir a proliferação, influenciar a

diferenciação e a função destas células. Dentre as células sensíveis a seus efeitos encontram-se os monócitos/macrófagos, DC, NK, células T e B (Bieback *et al*, 2012; Gebler *et al*, 2012; Keating, 2012; English, 2013; English e Wood, 2013).

CTMs expressam os receptores de quimiocinas CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 e CCR10, que podem estar envolvidos em sua migração, de acordo com o gradiente quimiotático (Gebler *et al*, 2012). Os efeitos mediados pela CTMs sobre as células imunes abrangem diversos mecanismos, e dentre esses se destaca a secreção de fatores solúveis. Vários fatores de efeito parácrino são secretados pelas CTMs, como, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e hormônios. Dentre esses, as citocinas IL-6, IL-10, o fator inibidor da leucemia (do inglês *leucemia inhibitory factor*, LIF), o fator de célula-tronco (do inglês *stem-cell factor*, SCF), fator transformador de crescimento beta (do inglês *transforming growth factor* TGF- β), VEGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), *Jagged 1* e *angiomin 1* (Ang 1) (Gebler *et al*, 2012).

O microambiente pode ser modulado através da secreção de fatores imunossupressores pelas CTMs, tais como, IL-10, TGF- β , VEGF, HLA-G solúvel, HGF, IDO, NO e PGE-2 (Gebler *et al*, 2012; English, 2013). Além disso, as CTMs são capazes de alterar o perfil de citocinas de outras células, como DCs, NKs e células Th1 e Th2, suprimindo a secreção das citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL1- β e TNF- α e aumentando a secreção das citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Gebler *et al*, 2012).

É conhecido que TLR-2, 3, 4, 7 e 9 são expressos em CTMs, bem como a participação destes receptores na ação imunomoduladora destas células. A ativação desses receptores pelos respectivos ligantes interfere no perfil secretório das CTMs e pode influenciar na proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência de outras células do sistema imunológico (Gebler *et al*, 2012; English *et al*, 2013). Além disso, os TLRs participam na polarização das CTMs para fenótipo pró-inflamatório ou supressivo conforme a ativação de TLR 4 ou 3 respectivamente (Keating, 2012; English, 2013; English e Wood, 2013).

Outro componente da imunidade inata que influencia os efeitos das CTMs é o sistema complemento (English *et al*, 2013; English e Wood, 2013). CTMs migram em resposta aos componentes C1q, C3a, e C5a. Um efeito protetor ao dano oxidativo é instituído nas CTMs através da estimulação dos receptores de C3a e C5a. Altos níveis de C3 ativado afetam com a capacidade imunoregulatória das CTMs. Além disso, CTMs

expressam CD59, uma proteína regulatória do sistema complemento, também relacionada com o fator H que protege contra a lise causada pelo sistema complemento (English e Wood, 2013).

CTMs inibem a proliferação de células NK ativadas por IL-2, através do contato direto e dos mediadores TGF- β , HLA-G solúvel e PGE-2 (Gebler *et al*, 2012; Keating, 2012). Também são capazes de influenciar a função efetora de células NK, como a citotoxicidade contra células infectadas que é acompanhada de redução na secreção de IFN- γ . Estes efeitos estão associados com a redução da expressão dos receptores de ativação da NK, mediada principalmente por PGE2 e IDO (Gebler *et al*, 2012). Estudos que avaliam as interações entre células NK e CTMs mostram que estas afetam a proliferação das células NK, entretanto estas atuam sobre as CTMs podendo influenciar sua sobrevivência (Gebler *et al*, 2012; English *et al*, 2013).

DCs geradas na presença de CTMs secretam baixos níveis de IL-12 e TNF- α , altos níveis de IL-1 β e IL-10, além de expressarem baixos níveis de MHC classe II, das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80, CD83 e CD86, e do CCR7 *in vitro* e *in vivo* (English, 2013; Gebler *et al*, 2012; English e Wood, 2013). Estas alterações conferem às DCs um fenótipo mais tolerogênico que não se mostrou reversível mediante a estímulo com LPS (Gebler *et al*, 2012; English *et al*, 2013).

Vários estudos suportam a ideia de que as CTMs inibem ou interferem na diferenciação das DCs, e é consenso que este efeito é mediado por PGE-2, porém ainda é discordante a participação da IL-6 e a dependência de contato (English, 2013; Gebler *et al*, 2012; English *et al*, 2013; English e Wood, 2013). Entretanto, o estágio de desenvolvimento, a variação do microambiente e condições específicas podem influenciar no efeito que as CTMs exercem sobre as DC, por exemplo, efeito discrepante é observado na diferenciação da DC convencional e da DC plasmacitóide (English, 2013; English *et al*, 2013).

Diversos estudos mostram que as CTMs são capazes de modular a proliferação, ativação e função, tanto de linfócitos autólogos quanto alogênicos *in vitro* e *in vivo* (English e Wood, 2013). *In vitro*, as CTMs inibem a proliferação de células T ativadas por mitógenos, anticorpos CD3 e CD28 ou alo-antígenos, mostrando que o efeito antiproliferativo das CTMs ocorre de forma independente do método de ativação e não é restrita ao MHC. Quando na presença das CTMs, linfócitos apresentam uma reduzida expressão dos marcadores de ativação, tais como CD25, CD38 e CD69, e permanecem

na fase G0/G1 do ciclo celular (Gebler *et al*, 2012). Este efeito pode ser explicado pela hiporegulação da ciclina D2 e não expressão de moléculas co-estimulatórias, resultando em anergia de células T sem indução de apoptose, onde a ausência de apoptose é justificada pela secreção de IL-7 por CTMs (Gebler *et al*, 2012; Normanton *et al*, 2014). Além disso, CTMs também são capazes de influenciar a diferenciação de células T auxiliares em favor de subpopulações com perfil anti-inflamatório, por exemplo, a produção de IL-10 pelas CTMs favorece a expressão do fator de transcrição Foxp3 e supressão do ROR γ t, favorecendo a diferenciação de células Treg ao invés de células Th17 (English e Wood, 2013).

São descritos ainda outros importantes fatores envolvidos na indução de células Tregs (CD4+ ou CD8+, CD25+ e Foxp3+) promovida por CTMs, como os mediadores PGE-2, TGF- β 1 e contato direto (Gebler *et al*, 2012; English, 2013). Por fim, as moléculas HLA-G e B7-H4, constitutivamente expressas em CTMs, estão envolvidas com o seu efeito imunossupressor sobre a ativação das células T, proliferação e/ou citotoxicidade mediada por células T e NK (Gebler *et al*, 2012). Contudo, parece que os mecanismos de inibição de células T são variáveis conforme a espécie, por exemplo, em humanos e em macacos a principal via de inibição é através da ativação da enzima IDO e consequente depleção de triptofano, já em camundongos ocorre via NO sintetizado pela ativação da enzima iNOS (Keating, 2012).

Poucos estudos avaliam os efeitos das CTMs sobre as células B, porém sabe-se que em diferentes condições a CTM é capaz de bloquear a proliferação de células B, influenciar a produção de anticorpos e inibir as quimiocinas responsáveis por sua migração (Gebler *et al*, 2012; English *et al*, 2013; English e Wood, 2013). Todavia, a expressão de moléculas co-estimulatórias e a secreção de citocinas não é afetada (Gebler *et al*, 2012). Entretanto, English *et al* (2013) relatam que em modelo animal de lúpus eritematoso sistêmico, as CTMs não inibem a produção de auto-anticorpos, pelo contrário, agravam a doença aumentando seus níveis, mostrando que efeitos adversos podem ser observados em circunstâncias específicas e que mais estudos são necessários.

De acordo com os vários aspectos descritos, percebe-se que as CTM e FRC compartilham similaridades. Ambas as células estão presentes em órgãos linfoides, apresentam morfologia e características semelhantes quando cultivadas *in vitro*. Além disso, tem sido reportado o envolvimento de ambos os tipos celulares na resposta imune por mecanismos semelhantes.

As CTMs são provenientes da medula óssea, um órgão linfoide primário, cuja função principal não está relacionada à resposta imunológica, entretanto de acordo com inúmeros trabalhos, estas células possuem capacidade de interferir na ativação de várias células do sistema imunológico. Assim sendo, acreditamos que as FRCs, que se encontram em um órgão linfoide secundário o LN, cuja função principal é a resposta imunológica, apresentem também um papel regulador, descrito na literatura como tolerância periférica e contração de uma resposta imunológica já estabelecida.

Ressaltamos a escassez de estudos em humanos envolvendo as FRCs e também as DNCs a qual, mesmo em modelos murinos, muito pouco ainda se sabe. A falta de consenso encontrada na literatura e a carência de estudos em humanos destas células nos instiga a avaliar o envolvimento de FRCs e DNCs com a resposta imunológica em humanos.

2 HIPÓTESE GERAL

Nossa hipótese é que as FRCs derivadas de linfonodos humanos de forma similar às FRCs murinas e às CTMs humanas exercem papel regulatório sobre a resposta imunológica.

3 JUSTIFICATIVA

A elucidação da função e do real potencial das FRCs na espécie humana pode proporcionar conhecimento do desenvolvimento da resposta imune. Em modelos murinos existem fortes evidências da participação destas células na tolerância periférica, entretanto estudos sobre as populações de FRC de espécie humana são escassos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Isolar e caracterizar fenotípica e funcionalmente as células estromais de LNs humanos, mais precisamente as FRCs e as DNCs. Comparar as características encontradas nas FRCs e DNCs com CTMs humanas derivadas de medula óssea.

4.2 Específicos

- Isolar as FRCs e DNCs de LNs humanos periféricos e mesentéricos livres de patologias, e caracterizá-las fenotipicamente por citometria de fluxo e pela potencialidade de diferenciação em células da linhagem mesodérmica.
- Verificar a influência que as FRCs e DNCs exercem na proliferação e na expressão de moléculas de *homing* em linfócitos alogênicos derivados de LN e SP, mediante co-cultivo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Características amostral

As amostras do presente estudo foram coletadas de procedimentos cirúrgicos, onde os linfonodos eram removidos de pacientes com diferentes diagnósticos clínicos. Estes órgãos foram submetidos ao exame histopatológico, a fim de averiguar se estavam saudáveis ou comprometidos com doença (**Tabela 1**).

Tabela 1. Característica amostral. Linfonodo (LN). Sem sucesso no estabelecimento da linhagem (-). Sucesso no estabelecimento da linhagem (+).

Amostra	Diagnóstico clínico do paciente	Resultado anatomopatológico	Cultura celular
<u>LN Periféricos</u>			
LN 3	Neoplasia laríngea	Negativo	+
LN 4	Neoplasia laríngea	Negativo	+
LN 9	Neoplasia mamária	Negativo	-
LN 15	Neoplasia mamária	Negativo	+
<u>LN Mesentéricos</u>			
LN 1	Cistoadenofibroma seroso de ovário	Negativo	-
LN 2	Cistoadenofibroma seroso de ovário	Negativo	-
LN 5	Neoplasia retosigmoide	Negativo	+
LN 6	Adenocarcinoma de reto	Metástase	+
LN 7	Doador saudável (Fígado)	Negativo	+
LN 8	Doador saudável (Fígado)	Negativo	+
LN 10	Diverticulite	Negativo	+
LN 11	Diverticulite	Negativo	+
LN 12	Diverticulite	Negativo	+
LN 13	Diverticulite	Negativo	+
LN 14	Neoplasia pancreática	Negativo	+

5.2 Análise anatomopatológica e histoquímica

O exame anatomopatológico foi realizado pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Israelita Albert Einstein. Para este procedimento, metade dos LNs doados

para pesquisa foram transferidos para o formaldeído 10%. As peças foram desidratadas em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%), passados em álcool absoluto e em xilol. Em seguida, foi realizada a impregnação e inclusão em parafina. As peças foram cortadas com espessura de 3µm e colocadas em lâminas de microscopia previamente preparadas, mantidas em estufa a 37°C e submetidas às colorações com hematoxilina e eosina (coloração de HE), além de marcação individual com os anticorpos gp38 (clone:D2/40), CD20 (clone:L26), CD3 (Polyclonal) e CD68 (clone:PGM-1).

5.3 Obtenção de células estromais e linfócitos a partir de linfonodos humanos

Os LNs periféricos e mesentéricos foram obtidos de pacientes de diferentes idades e diagnósticos, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Projeto e TCLE aprovados pelos comitês de ética em pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-FMUSP sob CAAE número: 07768712.4.0000.0071). Os LNs foram coletados em cerca de 5mL de meio de cultura (Mc1), contendo: o meio de cultura Meio de Dulbeco Modificado (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), 1% de uma solução antibiótico-antimicótico composto por 10000 unidades/mL de penicilina, 10000µg/mL de streptomina e 25µg/mL de Fungizone® (Gibco, Carlsbad, CA), e 1% de L-glutamina 200mM (Gibco, Carlsbad, CA).

Após a coleta, os LNs foram colocados em placas de Petri e partidos ao meio com auxílio de bisturi e pinça estéril. Metade deste órgão foi colocado em formaldeído e encaminhado à Patologia Clínica para a realização da avaliação histológica, já a outra metade foi utilizada para a obtenção de linfócitos presentes no interior do órgão. Os linfócitos foram liberados do órgão quando a metade restante do linfonodo foi cortada em pequenos pedaços. O Mc1 contendo os linfócitos foi transferido para um tubo cônico de 15mL e centrifugado por 5 minutos a 22°C/500g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso e submetido à contagem de células com coloração de azul de tripan 0,4%. Estes linfócitos foram congelados em meio de congelamento (Mc2 - Mc1 com 10% de Dimetilsulfóxido - DMSO); cada tubo continha cerca de 2×10^6 células/mL. Os tubos de congelamento foram colocados no freezer -80°C, dentro do recipiente de

congelamento (Nalgene®), o qual oferece o declínio gradual de temperatura, cerca de 1°C/min.

Após a remoção dos linfócitos, metade do órgão foi macerado com auxílio de um bisturi e colocados em cerca de 10mL de solução balanceada de *Hank* (do inglês *Hank's balanced salt solution*, HBSS) (Gibco, Carlsbad, CA) e submetida a centrifugação por 10 minutos a 22°C/500g, para lavagem dos tecidos linfóides. Após a lavagem, a amostra foi colocada em 10mL de solução enzimática (MIX), composta por: 9mL de HBSS, 1mL de accutase (Innovative cell technologies, San Diego, CA), 0,6ng colagenase tipo II/mL, 1μL de turbo DNase, 1μL de tampão da turbo DNase (Invitrogen). O MIX contendo a amostra foi incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos sendo submetido ao agitador mecânico em intervalos de 5 minutos, para auxiliar a digestão completa do tecido e a liberação das células estromais.

A seguir, o LN foi colocado novamente em placas de Petri para desagregação final do tecido com auxílio de seringa e agulha. Em seguida, o MIX contendo a amostra foi centrifugado por 5 minutos a 22°C/500g, o sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em Mc1 e cerca de 1×10^6 células/mL foram colocadas em frascos de cultura de 25cm², e incubadas em estufa a 5% CO₂ e 37°C. Após 48 horas, foi realizada a primeira troca do Mc1, desprezando o Mc1 juntamente com as células que não aderiram à superfície plástica das garrafas de cultura e substituindo o meio descartado por um novo Mc1 (5mL/frasco). As demais trocas de meio de cultura ocorreram em dias alternados.

5.4 Cultivo celular

As células aderidas ao frasco plástico de cultura no primeiro plaqueamento foram consideradas células na passagem (P) zero e a cada replaqueamento avançaram uma passagem, seguindo então para P1, P2, P3 e assim sucessivamente. Todos os procedimentos realizados com FRCs utilizaram células entre a 3ª e a 6ª passagens, preferencialmente na 4ª passagem. Todas as células obtidas foram testadas para verificar se haviam contaminação aeróbica, anaeróbica ou com *Mycoplasma sp.* Quando as células atingiram cerca de 90% de confluência, elas foram submetidas ao replaqueamento e/ou ao congelamento sempre na proporção de 1:3. Para ambos os procedimentos, o Mc1 foi removido e a superfície do frasco de cultura foi lavada duas vezes com o tampão fosfato-salino sem cálcio e sem magnésio (do inglês *Phosphate buffered saline*, PBS) (Gibco, Carlsbad, CA), seguido da aplicação de 1-2mL/25cm² de tripsina (TrypLE™ express)

(Gibco, Carlsbad, CA) e então as garrafas de cultura foram levadas à estufa 5%CO₂/3 min /37°C. Após as células se soltarem do frasco de cultura, as mesmas foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL com o respectivo meio, e então congeladas e/ ou passadas na proporção 1:3 frascos de cultura.

5.5 Obtenção de linfócitos alogênicos a partir de sangue periférico

Os linfócitos foram obtidos a partir de sangue periférico de doadores saudáveis voluntários. Após a coleta de sangue periférico realizada em frasco contendo o anticoagulante EDTA, o sangue foi transferido para um tubo cônico de 50mL para ser diluído com solução de PBS na proporção 1:1. Em um novo tubo, foi adicionado ficoll com densidade de 1.077 (Ficoll-Paque® -GE Healthcare, United Kingdom) e sobre este, acrescentou-se a amostra de sangue na proporção 1:1,5. O tubo foi centrifugado por 30 minutos a 22°C/500g, sem breque.

A fração linfomononuclear foi separada da interface do soro e da solução de separação com auxílio de uma pipeta e transferida para um novo tubo cônico de 15mL. Foi adicionado 5mL de PBS e o tubo foi novamente centrifugado por 10 minutos a 22°C/500g, para lavagem e retirada da solução de separação em contato com as células. O sobrenadante foi dispensado e as células foram ressuspensas em 5mL de Mc1 e centrifugadas pela terceira vez, por 10 minutos a 22°C/100g. Após a última centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspensado em meio de cultura Xvivo 15 (Cambrex, Walkersville, MD), suplementado com 1% de soro humano AB (Life Technologies, Carlsbad, CA) e 1% da solução de Antibiótico-Antimicótico (Gibco, Carlsbad, CA).

5.6 Obtenção, cultivo e caracterização de CTMs

As células armazenadas pelo nosso grupo, foram obtidas, cultivadas e caracterizadas de acordo com Deus *et al* (2012). Os resultados previamente obtidos e publicados utilizando as CTMs serviram de controle para os nossos experimentos.

5.7 Co-cultivo celular de FRCs ou DNCs com linfócitos alogênicos isolados a partir de linfonodos ou de sangue periférico estimulados por PHA

Após o estabelecimento das culturas com FRCs ou DNCs, estas células foram cultivadas separadamente ou na presença de linfócitos alogênicos oriundos de LN ou de sangue periférico durante 72 horas. Cerca de 2x10⁴ células foram adicionadas em placa

de 24 poços e após atingirem a confluência de 90%, foram adicionados cerca de 3×10^5 linfócitos, juntamente com 0,5µg mitógeno fitohemaglutinina (do inglês *Phytohaemagglutinin-PHA*). Os ensaios de co-cultivo foram realizados em triplicata.

5.8 Caracterização imunofenotípica de FRCs, DNCs e linfócitos por citometria de fluxo

As análises imunofenotípicas das FRCs e linfócitos foram realizadas através da citometria digital multiparâmetro (FACS Fortessa – Becton Dickinson/BD) e os experimentos foram conduzidos com anticorpos para a marcação de superfície e intracelular disponíveis comercialmente. As técnicas de coloração, aquisição foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante. Foram utilizadas cerca de 1×10^5 células/tubo para a marcação com os anticorpos de interesse.

Para a identificação e caracterização das FRCs, foram utilizados dois tubos. Os anticorpos utilizados com seus respectivos fluorocromos estão descritos na **Tabela 2**. Como controle da especificidade das fluorescências foi realizado o controle de fluorescência menos um (*do inglês Fluorescence Minus One, FMO*).

Tabela 2. Painel utilizado na identificação e caracterização das FRCs

Canal de leitura	Tubo 1	Tubo 2
FITC	CD 106	CD35
PE	CD73	CD34
PE-CF594	CD105	CD105
PercP-Cy55	CD44	CD44
PE-Cy7	CD90	CD90
APC	CD29	gp38
APC-H7	HLA-DR	HLA-DR
Alexa 700	CD14	CD14
V450	CD31	CD31
V500	CD45	CD45

A **Tabela 3** descreve os anticorpos utilizados para a identificação e caracterização dos linfócitos. Controle isotópico foi utilizado como controle de especificidade das fluorescências.

Tabela 3. Painel utilizado na identificação, caracterização e avaliação de moléculas de homing em linfócitos.

Canal de leitura	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
FITC	Ki67*	CCR5	IgG1
PE	CXCR4	CCR6	IgG1
PerCP	CD4	CD3	IgG1
APC	CD3	CCR7	IgG1

* Anticorpo intracelular

Resumidamente, as amostras foram incubadas com os anticorpos em temperatura ambiente, protegidas da luz, por 30 min. Após esse período, as células foram centrifugadas por 5 min à 22°C/500g, para eliminar o excesso de anticorpo, e em seguida foram ressuspensas em tampão de lavagem (PBS suplementado com 0,1% de albumina humana e 0,1% azida sódica).

Para a avaliação da proliferação de linfócitos, após a marcação dessas células com os anticorpos de superfície, foram adicionadas duas outras etapas para a realização da marcação intracelular, conhecidas como fixação e a permeabilização. A fixação foi realizada pela adição de 200µL da solução FACS Lysing (BD Biosciences, San Jose, CA), e em seguida ocorreu a permeabilização através da adição de 200µL da solução FACS de permeabilização 2 (BD Biosciences, San Jose, CA) e só então, os anticorpos intracelulares foram adicionados. Após a lavagem das células, foi acrescentado 200µL do tampão de lavagem para a realização da aquisição das amostras no equipamento.

Todas as informações sobre os anticorpos utilizados estão descritas na **Tabela 4**. Em todos os experimentos realizados foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada utilizando o software *FlowJo* (Treestar, Ashland, OR).

Tabela 4 - Informações sobre os anticorpos utilizados

Anticorpo	Fluoróforo	Clone	Empresa comercial
CD 34	PE	My10	BD
CD 73	FITC	AD2	BD
CD 35	FITC	E11	BD
HLA-DR	APC-H7	G46-6	BD
CD 90	PE-Cy7	SE10	BD
CD 44	PercP-Cy55	G44-26	BD
CD 29	APC	MAR04	BD
CD 45	V500	H130	BD
CD 31	V450	WM59	BD
CD 105	PE-CF594	266	BD

CD 14	Alexa 700	M5E2	BD
GP38	APC	♦	R&D
CD3	APC	HIT3a	BD
CD3	PerCP	SK7	BD
CD4	PerCP	SK3	BD
Ki67 *	FITC	MOPC-21	BD
CXCR4	PE	12G5	R&D
CCR5	FITC	CTC5	R&D
CCR6	PE	53103	R&D
CCR7	APC	150503	R&D

♦ Anticorpo policlonal

* Anticorpo intracelular

5.9 Separação celular

Após a análise imunofenotípica, as células foram separadas fisicamente através da citometria digital multiparâmetro (FACS Aria – Becton Dickinson/BD). Os experimentos foram conduzidos utilizando os anticorpos de superfície previamente descritos. As técnicas de coloração e aquisição foram realizadas de acordo com as boas práticas de laboratório e indicação do fabricante, a fim de se garantir a identificação, separação e esterilidade adequada. Para a marcação com o anticorpo gp38, cerca de 1×10^6 células foram utilizadas. Em seguida, estas células foram separadas de acordo com a expressão do gp38, sendo separadas as células gp38+ das células gp38-.

Após a separação celular, verificou-se a pureza das populações selecionadas. Estas células foram novamente cultivadas, e em seguida foi avaliado se as populações mantinham-se como gp38+ e gp38-. Posteriormente essas células foram utilizadas para realização dos experimentos.

5.10 Diferenciação em três linhagens mesodérmicas

As células armazenadas pelo nosso grupo, foram diferenciadas em três linhagens celulares: osteoblastos, adipócitos e condrócitos, de acordo com Deus *et al* (2012). Os resultados de CTMs obtidos e publicados em projetos anteriores serviram de controle para os nossos experimentos.

5.10.1 Diferenciação adipogênica

Para a indução da diferenciação adipogênica, 1×10^3 células foram plaqueadas em placa de cultura contendo 24 poços e após atingirem confluência próxima de 80%, o meio

Mc1 foi substituído pelo meio de indução adipogênico, constituído por meio alpha-MEM (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA), 1% Antibiótico-Antimicótico (Gibco, Carlsbad, CA), 1µM dexametasona (Sigma, St Louis, MO), 100ug/mL de isobutil-metil-xantina (Sigma, St Louis, MO), 10µg/mL de insulina (Sigma, St Louis, MO) e 100µM de indometacina (Sigma, St Louis, MO). O meio de indução adipogênica presente em cada poço foi substituído em dias alternados durante 21 dias. A diferenciação foi evidenciada com o auxílio da coloração de imuno-histoquímica conhecida como *oil-red*.

5.10.2 Diferenciação osteogênica

Para a indução da diferenciação osteogênica, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de cultura contendo 24 poços. Após atingirem confluência próxima de 80%, o meio Mc1 foi substituído pelo meio de indução osteogênica, constituído por meio alpha-MEM (Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA), 1% Antibiótico-Antimicótico (Gibco, Carlsbad, CA), 1µM dexametasona (Sigma, St Louis, MO), 2 µg/mL ácido ascórbico (Sigma, St Louis, MO) e 10µM de beta-glycerol-fosfato (Sigma, St Louis, MO). O meio de indução osteogênica presente em cada poço foi substituído em dias alternados durante 21 dias. A diferenciação foi evidenciada com o auxílio da coloração imuno-histoquímica conhecida como *alizarin-red*.

5.10.3 Diferenciação condrogênica

Para a indução condrogênica, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de cultura contendo 24 poços. Após atingirem confluência próxima de 80%, o meio Mc1 foi substituído pelo meio de indução condrogênica, constituído por meio alpha-MEM (Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA), 1µM dexamethasone (Sigma, St Louis, MO), 6,25 ug/mL de insulina (Sigma, St Louis, MO), 2ug/mL de ácido ascórbico (Sigma, St Louis, MO) e 10ng/mL de TGF-β (Sigma, St Louis, MO). O meio de indução condrogênica presente em cada poço foi substituído em dias alternados durante 21 dias. A diferenciação foi evidenciada com o auxílio da coloração imuno-histoquímica conhecida como *toluidine blue*.

5.11 Métodos de coloração histoquímica

5.11.1 Oil-red

A diferenciação adipogênica foi demonstrada pela coloração de gotas lipídicas com o corante *oil red O*. Após 21 dias de cultivo, as células foram lavadas com água destilada, fixadas com 4% paraformaldeído (Sigma, St Louis, MO) por 30 minutos, lavadas com água destilada, desidratadas em 60% isopropanol por 2-5 minutos e então foram coradas com o corante contendo 0,5% de *oil red O* (Sigma, St Louis, MO) diluído em 100% isopropanol. Após a secagem da placa, a análise foi realizada por microscopia óptica.

5.11.2 Alizarin-red

A diferenciação osteogênica foi demonstrada pela coloração da matriz de cálcio com o corante *alizarin-red*. Após 21 dias de cultivo, as células foram fixadas com 4% paraformaldeído (Sigma, St Louis, MO) por 30 minutos, lavadas com água destilada, coradas com o corante contendo 2g de *alizarin-red* diluídos em 100mL de água destilada, com pH 4,2 (Sigma, St Louis, MO), por 10-15 minutos e lavadas vigorosamente com água destilada. Após a secagem da placa, a análise foi realizada por microscopia óptica.

5.11.3 Toluidene-blue

A diferenciação condrogênica foi demonstrada pela coloração da matriz rica em proteoglicanos com o corante *toluidene-blue* após 21 dias de cultivo. As células foram coradas por 1-2 minutos com o corante contendo 1g de *toluidene-blue*, 1g de borato de sódio diluídos em 100mL de água destilada (Sigma, St Louis, MO). Em seguida as células foram lavadas com água e então fixadas com etanol 70% por 1 minuto, etanol 90% por 1 minuto e com etanol 100% 1 minuto. Após a secagem da placa, a análise foi realizada por microscopia óptica.

5.12 Análises de FACs

Dados gerados a partir do FACs Fortessa e Aria (BD Biosciences), foram analisados pelos softwares FACSDIVA (BD Biosciences) e FlowJo (Treestar, Eugene, OR).

5.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prisma. O teste *t-student* foi utilizado para comparação entre 2 grupos e ANOVA para comparações de mais de 2 grupos com correção de Bonferroni. Foi considerado significativo $p < 0,05$ em todos os experimentos.

6 RESULTADOS

6.1 A análise anatomopatológica e imunohistoquímica dos linfonodos evidenciou sua morfologia e integridade

Através de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE), avaliou-se a morfologia e a presença de metástase dos LNs obtidos. A maioria apresentou-se íntegra (**Figura 4 A**), exceto pela amostra LN06 que estava comprometida com a presença de metástase de adenocarcinoma de reto e portanto foi excluída.

Além da integridade tecidual do órgão verificada pela coloração de HE, avaliou-se a distribuição das seguintes células nos linfonodos humanos periféricos (PLN) e mesentéricos (MLN): células T, células B, macrófagos e células gp38+, segundo a marcação específica de CD3, CD20, CD68 e gp38, respectivamente (**Figura 4**). Para dados amostrais representativos, os LNs foram selecionados de modo que evidenciassem a heterogeneidade das amostras presentes no estudo, sendo que estas mostraram-se semelhantes na disposição celular. A presença de linfócito T pode ser observada no paracortex (ou zona de células T) (**Figura 4 B**); já os linfócitos B estão presentes nos folículos (ou zona de células B) (**Figura 4 C**) e os macrófagos se mostraram uniformemente espalhados por todo o LN (**Figura 4 D**). As células gp38+ foram encontradas no SCS, folículos, na zona de células T e nos vasos linfáticos, quando presentes (**Figura 4 E**).

A fim de avaliar a presença de FRCs observou-se a expressão de gp38 especificamente na zona de células T, o que revelou uma ligeira diferença na intensidade desta expressão entre as amostras. A representação da heterogeneidade amostral foi mantida (**Figura 5**).

Figura 4. Análise anatomopatológica e histoquímica de linfonodos (LNs) humanos. Imagem representativa de cortes histológicos de LNs humanos periféricos (PLN) e mesentéricos (MLN). **(A)** Marcação com hematoxilina e eosina (HE) **(B)** Localização de linfócitos T CD3+ nos LNs. **(C)** Localização de linfócitos B CD20+ nos LNs. **(D)** Localização de macrófagos CD68+ nos LNs. **(E)** Localização de células gp38+ nos LNs. Aumento de 10x.

PLN

MLN

Figura 5. Expressão de gp38 na zona de células T. Cortes histológicos de linfonodos humanos periféricos (PLN) e mesentéricos (MLN) mostram a expressão do gp38 (**pontilhado**) no aumento de 10x, com destaques para a zona de células T.

6.2 Células estromais isoladas de linfonodos humanos assemelham-se imunofenotipicamente às CTMs

Para a identificação das FRCs avaliou-se a expressão dos marcadores: CD73, CD105, CD44, CD90, CD29, CD14, CD31, CD34, CD106, CD35, CD45, HLA-DR e gp38. Este conjunto de marcadores permite a identificação e a caracterização de CTM, além de possibilitar a identificação de semelhanças fenotípicas entre CTM e FRC e propiciar a distinção entre FRCs de outros tipos celulares, como LECs, BECs e FDCs. Verificou-se que mais de 90% das células expressam CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105; a presença de duas subpopulações foi demonstrada de acordo com a expressão ou não de gp38 (FRCs e DNCs). Menos de 1% das células expressam CD14, CD34, CD35, CD45, HLA-DR, CD31 e CD106 (**Figura 6**).

Figura 6. Perfil de expressão fenotípica das células isoladas a partir de linfonodos humanos. (A) Estratégia de seleção populacional característica de células estromais (*gate* inicial), segundo o seu tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). (B) Histogramas selecionados a partir do *gate* inicial, para a caracterização das FRCs pela expressão de gp38 e não expressão de CD31 (Excluindo BEC e LEC). (C) Histogramas selecionados a partir do *gate* inicial, mostram células sem marcação (linha vermelha) e as células marcadas (linha azul).

6.3 As células estromais isoladas a partir de linfonodos humanos são FRCs e DNCs

FRCs são células caracterizadas pela expressão do gp38 e não expressão dos marcadores CD31 e CD35. Verificamos que 100% das células cultivadas por 4 passagens não expressavam CD31 ou CD35 e apresentavam 2 subpopulações de acordo com a expressão de gp38. Cerca de $42,33 \pm 7,88\%$ das células representa uma subpopulação gp38+, as FRCs e $59,01 \pm 7,87\%$ representa uma população descrita na literatura como dupla-negativa (DNC) (**Figura 7**). De acordo com nossos achados, investigamos a possibilidade de separação das populações FRCs (gp38+ e CD31-) e DNCs (gp38- e CD31-) por *Cell Sorting* e novo cultivo para investigar diferenças funcionais entre elas (**Figura 8**).

Figura 7. Expressão de gp38 em células isoladas a partir de linfonodos humanos. Porcentagem de células gp38+ e gp38-, caracterizando as células como duplo-negativas (DNC) e células reticulares fibroblásticas (FRC), respectivamente. (n=7).

6.4 Separação das FRCs e DNCs por *cell sorting*

Após a caracterização, as FRCs (gp38+ e CD31-) e DNCs (gp38- e CD31-) foram separadas fisicamente por *cell sorting* (**Figura 8**). Em seguida, foram novamente cultivadas para realização de novos ensaios.

Figura 8. Separação física de FRCs e DNCs (*Cell Sorting*) proveniente de linfonodos humanos. (A) *Gate* inicial característico de células estromais, segundo o seu tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC). (B) Seleção seguida de separação das células que expressavam gp38 e daquelas que não expressavam, a partir do *gate* inicial. (C) Avaliação da pureza após a separação das células gp38 negativas (DNC), segundo a não expressão do marcador. (D) Avaliação da pureza após a separação das células gp38 positivas (FRC), segundo a expressão do marcador.

6.5 FRCs e DNCs são capazes de se diferenciar em populações de origem mesodérmica: adipócito, osteócito e condrócito

Avaliou-se a capacidade de diferenciação das FRCs (gp38+ e CD31-) e DNCs (gp38- e CD31-) em três linhagens celulares: osteócito, condrócito e adipócito. Tanto as FRCs quanto as DNCs mostraram-se capazes de diferenciar-se em condrócitos, adipócitos e osteócitos (**Figura 9**). A diferenciação em condrócito pode ser observada pela formação da matriz de proteoglicanos evidenciada pela coloração com azul de toluidina (**Figura 9 A**). Já a diferenciação em adipócito pode ser observada pela formação de gotículas citoplasmáticas de lipídeos, coradas com *oil red* (**Figura 9 B**), enquanto que a diferenciação em osteócito pode ser observada pela formação de matriz de cálcio evidenciada pela coloração com *Alizarin red* (**Figura 9 C**).

Figura 9. Diferenciação de FRCs e DNCs em condrócito, adipócito e osteócito. (A) Marcação com azul de toluidina mostrando a formação da matriz de proteoglicanos na diferenciação condrogênica. (B) Formação de gotas lipídicas marcadas com Oil Red na diferenciação adipogênica. (C) Formação da matriz

de cálcio evidenciado pela marcação com Alizarin red na diferenciação osteogênica. **Controle:** Células cultivadas somente com o meio de cultura α -MEM; **Diferenciação:** Células cultivadas com meio de diferenciação específico. **Aumento:** 10x e 20x.

6.6 Influência das FRCs e DNCs na proliferação e expressão das moléculas de *homing* em linfócitos alogênicos (Ensaio funcional)

6.6.1 A presença de FRC e DNC diminui a proliferação de linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo

Devido à semelhança entre FRCs, DNCs e CTMs, avaliamos se as FRCs e DNCs poderiam interferir na proliferação dos linfócitos alogênicos de modo semelhante ao já descrito em CTMs. Com esta finalidade, avaliamos a proliferação de linfócitos alogênicos derivados do LN ou do SP usando como parâmetro a expressão da proteína nuclear Ki-67. Os linfócitos alogênicos foram tratados com PHA durante 72 horas e analisados por citometria de fluxo quanto à frequência de linfócitos CD3⁺ corados pelo Ki-67 na ausência de outro tipo celular (controle) e mediante ao co-cultivo com FRCs ou DNCs.

O percentual dos linfócitos alogênicos Ki-67⁺ derivados do LN cultivados isoladamente foi de $20,35 \pm 0,45\%$, entretanto, na presença de FRCs este percentual diminuiu significativamente ($p=0.016$) para $13,05 \pm 0,85\%$. De maneira semelhante, quando na presença de DNCs houve redução significativa ($p=0.004$) do percentual para $13,15 \pm 0,15\%$ (**Figura 10 A**). Adicionalmente, apresentamos para ilustração, gráficos tipo *dot plot* de citometria representativa para a diminuição observada (**Figura 10 B**).

A proliferação dos linfócitos alogênicos oriundos do SP não foi significativamente diferente após o co-cultivo com FRCs e DNCs, comparados ao grupo controle (**Figura 10 C**).

Figura 10. Proliferação de linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs. (A) Expressão de Ki-67 nos linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo (LN) na ausência de outro tipo celular (CTRL) e juntamente com FRCs ou DNCs. (B) Dado representativo da significância observada quanto a expressão de Ki-67 nos linfócitos alogênicos derivados do LN cultivados isoladamente (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. (C) Expressão de Ki-67 nos linfócitos alogênicos oriundos do sangue periférico (SP) privados de outras células (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. Todos os linfócitos foram estimulados com PHA e cultivados por 72 horas (n=3).

6.6.2 FRCs e DNCs alteram a expressão das moléculas de *homing* nos linfócitos alogênicos

Para avaliarmos se as FRCs e DNCs poderiam interferir na migração dos linfócitos alogênicos, verificamos a expressão de moléculas relacionadas à migração, como CCR7, CXCR4, CCR5 e CCR6 nos linfócitos alogênicos derivados do LN ou do SP estimulados com PHA durante 72 horas na presença ou não de FRCs e DNCs.

Linfócitos alogênicos provenientes tanto de LN quanto de SP não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle quanto à expressão de CCR7 quando cultivados na presença de FRC e DNCs (**Figura 11**).

Figura 11. Expressão do receptor de quimiocina CCR7 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs. (A) Expressão de CCR7 nos linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo (LN) sem a presença de outro tipo celular (CTRL) e cultivados com FRCs ou DNCs. (B) Expressão de CCR7 nos linfócitos alogênicos provenientes do sangue periférico (SP) privados de outras células (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. Todos os linfócitos foram estimulados com PHA e cultivados por 72 horas (n=3).

A expressão de CXCR4 nos linfócitos alogênicos provenientes do LN na ausência de outras células foi de $39,25 \pm 3,45\%$, quando co-cultivados com FRCs a expressão de CXCR4 diminuiu de forma significativa ($p=0.031$) para $20,20 \pm 0,10\%$. Similarmente, quando co-cultivados na presença de DNCs houve diminuição significativa ($p=0.033$) desta expressão para $20,40 \pm 0,70\%$ (**Figura 12 A**).

Em linfócitos alogênicos derivados do SP a expressão de CXCR4 quando isolados foi de $54,28 \pm 1,71\%$ e em co-cultivo com FRCs esta expressão reduziu significativamente ($p=0.002$) para $36,75 \pm 3,75\%$. Da mesma maneira, o co-cultivo com DNCs ocasionou uma significativa ($p=0.0005$) diminuição da expressão de CXCR4 para $31,75 \pm 2,15\%$ (**Figura 12 C**). A redução significativa na expressão de CXCR4 em linfócitos alogênicos provenientes do LN e SP é ilustrada através de dados representativos de citometria (**Figura 12 B e D, respectivamente**).

Figura 12. Expressão do receptor de quimiocina CXCR4 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs. (A) Expressão de CXCR4 nos linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo (LN) excluídos de outro tipo celular (CTRL) e mediante ao co-cultivo com FRCs ou DNCs. (B) Dado representativo da redução significativa observada quanto à expressão de CXCR4 nos linfócitos alogênicos derivados do LN na ausência de outro tipo celular (CTRL) e na presença de FRCs ou DNC. (C) Expressão de CXCR4 nos linfócitos alogênicos oriundos do sangue periférico (SP) isolados de outras células (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. (D) Ilustração representativa da significância analisada quanto a expressão de CXCR4 nos linfócitos alogênicos provenientes do sangue periférico (SP) na ausência (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. Todos os linfócitos foram estimulados com PHA e cultivados por 72 horas (n=3).

A expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos oriundos tanto do LN quanto do SP não foi significativamente diferente na presença de FRCs em comparação ao controle. Entretanto, a presença de DNCs alterou de maneira significativa a expressão de CCR5 em linfócitos derivados de LN e SP. A expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos derivados do LN cultivados sem a presença de outra célula foi de $5,22 \pm 0,40\%$, quando em co-cultivo com DNCs esta expressão aumentou significativamente ($p=0,018$) para $7,55 \pm 0,09\%$ (**Figura 13 A**). Já a expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos derivados do SP privados de outro tipo celular foi de $25,87 \pm 4,11\%$, quando cultivados com DNCs esta expressão diminui de forma significativa ($p=0,031$) para $10,48 \pm 0,82\%$ (**Figura 13 D**). Esses resultados estão representados nos gráficos de citometria de fluxo nas **figuras 13 B e C**, respectivamente.

Figura 13. Expressão do receptor de quimiocina CCR5 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs. (A) Expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo (LN) cultivados isoladamente (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. (B) Análise representante da significância observada quanto à expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos derivados do LN na ausência de outro tipo celular (CTRL) e na presença de DNCs. (C) Dado representativo da significância verificada

quanto a expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos provenientes do sangue periférico (SP) isolados de outro tipo celular (CTRL) e na presença de DNC. **(D)** Expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos oriundos do sangue periférico (SP) privados de outras células (CTRL) e cultivados juntamente com FRCs ou DNCs. Todos os linfócitos foram estimulados com PHA e cultivados por 72 horas (n=3).

A expressão de CCR6 em linfócitos alogênicos provenientes do LN quando isolados foi de $20,68 \pm 1,93\%$, no entanto, na presença de FRCs esta proliferação diminuiu ($p=0.017$) para $9,08 \pm 1,01\%$. De maneira similar, quando na presença de DNCs se observou redução significativa ($p=0.026$) desta expressão para $10,63 \pm 0,77\%$ (**Figura 14 A**). Evidenciamos estes dados através de gráficos representativos de citometria de fluxo (**Figura 14 B**).

Entretanto, nos linfócitos alogênicos derivados do SP não houve diferença significativa em relação ao grupo controle quanto à expressão de CCR6 após o co-cultivo com FRCs ou DNCs (**Figura 14 C**).

Figura 14. Expressão do receptor de quimiocina CCR6 nos linfócitos alogênicos após co-cultivo com FRCs e DNCs. **(A)** Expressão de CCR6 nos linfócitos alogênicos provenientes do linfonodo (LN) na ausência (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. **(B)** Ilustração representativa da significância verificada quanto à expressão de CCR6 nos linfócitos alogênicos derivados do LN na ausência de outro tipo celular (CTRL) e na presença de FRCs ou DNCs. **(C)** Expressão de CCR6 nos linfócitos alogênicos provenientes do sangue periférico (SP) privados (CTRL) e mediante ao co-cultivo FRCs ou DNCs. Todos os linfócitos foram estimulados com PHA e cultivados por 72 horas (n=3).

7 DISCUSSÃO

A análise anatomopatológica dos cortes histológicos de LNs corados com HE tem por finalidade evidenciar características e alterações morfológicas que indicam o grau de comprometimento do órgão, sendo inclusive utilizadas no diagnóstico de doenças. Dentre as amostras analisadas, apenas um LN apresentou-se comprometido com a presença de células com características malignas, muco, comprometimento tecidual e estrutural, caracterizando metástase e portanto foi excluído das análises posteriores. Portanto, todos os linfonodos incluídos neste estudo não estavam comprometidos com doença.

Utilizando as marcações específicas para linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e células gp38+, ou seja, CD3, CD20, CD68 e gp38 respectivamente, foi possível observar a localização geral e específica destas células nos LNs. Como esperado, a disposição celular foi semelhante nas diferentes amostras analisadas. Assim como descrito na literatura, detectou-se a presença de linfócito T na zona de células T, linfócitos B na zona de células B, e macrófagos uniformemente espalhados por todo o linfonodo (Muller e Germain, 2009; Junt *et al*, 2008). Foi evidenciado que, as amostras incluídas no estudo apresentaram integridade na arquitetura do órgão, na disposição celular natural e que as principais regiões do LN puderam ser devidamente caracterizadas.

A avaliação da distribuição das células que expressam positivamente gp38 no LN apresentou ligeira diferença, entre as amostras, quanto à intensidade de expressão da gp38 podendo estar relacionada com a função desta molécula ou com a condição específica do nicho. Entretanto observamos que em todos os LNs, apesar de diferentes intensidades, havia a presença das células positivas para gp38 nas regiões SCS, folículos e na zona de células T. Os resultados são coerentes com os dados da literatura que descrevem a localização das FRCs (Crivellato e Mallardi, 1997; Link *et al* , 2007) e MRCs (Luther *et al* , 2011; Muller e Germain, 2009) no SCS; FDC expressando a gp38 nos folículos (Luther *et al*, 2011); e FRC na zona de células T classicamente caracterizada pela expressão de gp38 (Katakai *et al*, 2004; Hara *et al*, 2006; Link *et al*, 2007; Mueller e Germain, 2009; Steele *et al*, 2009; Turley *et al*, 2010; Khan *et al*, 2011; Luther *et al*, 2011; Link *et al*, 2011; Onder *et al*, 2011; Fletcher *et al*, 2011(a) (b); Frontera *et al*, 2011; Siegert *et al*, 2011; Lukacs-Kornek *et al*, 2011; Sierget e Luther, 2012; Hess *et al*, 2012; Malhotra *et al*, 2012).

Após avaliar a integridade tecidual, a presença das principais populações celulares no LN, bem como a distribuição das células gp38 positivas no LN, as células isoladas

foram caracterizadas e avaliadas de acordo com sua semelhança com as CTMs. Segundo a ISCT, os critérios mínimos para que uma célula seja considerada CTMs são: aderência ao plástico; expressão de CD105, CD73 e CD90, e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14, CD19, CD31 e HLA-DR; capacidade de diferenciação nas três linhagens mesodérmicas clássicas: condrócitos, adipócitos e osteócitos (Dominici *et al* , 2006).

As células isoladas a partir dos LNs humanos eram aderentes ao plástico atendendo o primeiro critério instituído pela ISCT. Após o estabelecimento das linhagens, as células foram caracterizadas de acordo com a expressão de gp38 e CD31, como discutido adiante. A fim de distinguir as FRCs de outros tipos celulares gp38 positivos como LECs e FDCs, avaliamos a expressão de CD31 e CD35, presentes respectivamente nestas células, e confirmamos a ausência da expressão destes marcadores nas células isoladas, garantindo que as células gp38+ isoladas eram FRCs e não LECs ou FDCs. As células isoladas também foram negativas para os marcadores de células diferenciadas e progenitores hematopoiéticos CD14, CD34 e CD45 e HLA-DR. Paralelamente, avaliou-se a expressão de marcadores característicos das CTMs nas células isoladas a partir de LNs humanos. Identificamos a expressão acima de 90% de CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 nas células isoladas, e menos de 1% de expressão de CD14, CD31, CD34, CD35, CD45, CD106 e HLA-DR, corroborando que células estromais de LNs humanos são imunofenotipicamente semelhantes às CTMs e que atendem o segundo critério para serem consideradas CTMs.

A expressão da gp38 tem sido relacionada ao desenvolvimento embrionário de alguns órgãos, motilidade celular e está fortemente associada com a presença de metástase (Astarita *et al*, 2012). Em modelos murinos, as FRCs são células identificadas pela expressão da gp38 e ausência da expressão do CD31. Embora a gp38 tenha sido pouco avaliada em FRCs humanas, o estudo realizado por Fletcher e colaboradores (2011a) compara o isolamento e caracterização dessas células entre LNs murinos e humanos, e cuja metodologia mais se assemelha ao nosso estudo, reportou a utilização deste marcador para caracterização das FRCs humanas (Fletcher *et al*, 2011a). Em nosso estudo, verificamos que em média 42% das células isoladas dos LNs expressam a gp38 (FRCs, gp38+ e CD31-) e 58% não expressam (DNCs, gp38- e CD31-) caracterizando 2 subpopulações celulares nas culturas.

Devido à presença de duas subpopulações celulares distintas, separamos-as por seleção (*cell sorting*) utilizando o marcador gp38+ para iniciar os estudos funcionais.

Inicialmente, investigamos a capacidade de diferenciação das FRCs (gp38+ e CD31-) e DNCs (gp38- e CD31-) nas três linhagens celulares: osteócito, condrócito e adipócito. Apesar de ambas não serem descritas como células potencialmente capazes de diferenciar-se nas três linhagens, tanto as FRCs quanto as DNCs mostraram-se aptas a se diferenciar em osteócito, condrócito e adipócito. Portanto, evidenciamos que FRCs e DNCs atendem todos os critérios mínimos propostos pela ISCT para serem consideradas CTMs.

A seguir, iniciamos os estudos funcionais e avaliamos a proliferação de linfócitos alogênicos derivados do linfonodo (LN) ou sangue periférico (SP) co-cultivados com FRCs ou DNCs após estímulo. Decidimos avaliar linfócitos alogênicos derivados de LN e SP para verificar se havia diferença da resposta dependendo da fonte de linfócito utilizada, ou seja, se linfócitos provenientes de SP responderiam da mesma forma que linfócitos derivados de LN. Como não dispomos de linfócitos autólogos derivados de SP destes pacientes, apenas de LN, realizamos os ensaios utilizando linfócitos alogênicos de ambas as fontes.

Observamos que as FRCs e DNCs diminuíram significativamente a proliferação dos linfócitos alogênicos provenientes de LN comparados ao controle, mas não influenciaram de forma significativa a proliferação dos linfócitos alogênicos provenientes do SP. Este achado pode ser explicado devido ao prévio contato dos linfócitos alogênicos com as FRCs e DNCs presente no LN do qual estas células são provenientes.

Em camundongos, foi observado que células estromais de LNs, incluindo FRCs, são capazes de diminuir a proliferação de linfócitos T durante a resposta imunológica específica *in vitro* quando co-cultivadas com células murinas de semelhante *background* genético (Lukacs-Kornek *et al*, 2011; Khan *et al*, 2011). Dentre os trabalhos verificados na literatura, não encontramos estudos que avaliaram a implicação das FRCs e DNCs derivadas de LNs humanos livres de patologias na resposta alogênica. Deste modo, expomos um interessante contexto no qual as FRCs e DNCs possam estar envolvidas.

Conhecido o efeito das FRCs e DNCs sobre a proliferação de linfócitos alogênicos, analisamos a influência de ambas as células na expressão das moléculas de *homing*, a fim de avançarmos no conhecimento do papel destas células em contexto alogênico, uma vez que a migração celular é essencial para que aconteça as interações celulares necessárias para a resposta imune efetora ou para que ocorra tolerância.

Linfócitos que expressam CCR7 são atraídos até a zona de células T no LN pelas quimiocinas CCL19 e CCL21 produzidas pelas FRCs (Griffith *et al*, 2014; Moser *et al*, 2014; Munoz *et al*, 2014). Em nossos resultados, a expressão do CCR7 foi semelhante entre os linfócitos controles estimulados provenientes do LN e SP e esta expressão não foi alterada pela presença de FRCs ou DNCs. Sierget e colaboradores (2011) descrevem que em contraste das TRCs murinas recém isoladas, as TRCs após cultivo *in vitro* expressam baixos níveis de transcritos de CCL19, CCL21 e IL7. Embora as FRCs sejam descritas como importantes produtoras de CCL19 e CCL21, acreditamos que uma das possibilidades pelas quais não observamos alteração na expressão do CCR7 em linfócitos alogênicos na presença de FRCs seja devido à condição *in vitro* de cultivo celular.

Adjunto ao CCR7, a expressão de CXCR4 auxilia a entrada de linfócitos T *naive* nos LNs através da ligação à quimiocina CXCL12 produzida por FRCs (Griffith *et al*, 2014). Na ausência de outras células, observamos que a expressão de CXCR4 era maior nos linfócitos alogênicos controles estimulados provenientes do SP. No entanto, em co-cultivo com FRCs ou DNCs esta expressão diminuiu significativamente. Bermejo e colaboradores (1998) ao avaliarem a expressão de CXCR4 em linfócitos recém isolados do SP e após cultivo relataram que linfócitos recém isolados apresentam baixa expressão de CXCR4 na superfície celular e esta expressão é aumentada com o cultivo *in vitro*. Este grupo também descreve que a expressão de CXCR4 é reduzida com a produção de CXCL12, assim como ocorre com a estimulação por PHA. Como todos os linfócitos alogênicos controles e co-cultivados deste estudo foram estimulados com PHA, é possível que a diminuição da expressão de CXCR4 observada na presença de FRCs e DNCs ocorra em consequência da produção de CXCL12 por estas células, uma vez que já foi descrita a produção de CXCL12 por FRCs (Katakai *et al*, 2004; Amé-Thomas *et al*, 2007; Fletcher *et al*, 2011(b); Malhotra *et al*, 2012).

A expressão de CCR5 nos linfócitos estimulados foi maior nos alogênicos controles provenientes de SP. Observamos ainda que somente a presença de DNCs foi capaz de influenciar a expressão de CCR5 nos linfócitos alogênicos, porém de maneira diferente. DNCs foram capazes de aumentar a expressão de CCR5 em linfócitos proveniente do LN e diminuir esta expressão nos linfócitos oriundos do SP. As razões deste fenômeno ainda não estão claras, porém, observamos que tanto em linfócitos provenientes do LN quanto os de SP apresentaram porcentagem semelhante de CCR5 após co-cultivo com DNCs.

Por fim, observamos que a expressão do CCR6 foi maior nos linfócitos controles derivados do LN, entretanto na presença de DNCs e FRCs ambos linfócitos diminuíram a sua expressão significativamente. Katakai e colaboradores (2004) descrevem que FRCs murina produzem CCL20, uma das quimiocinas ligantes de CCR6 (Griffith *et al*, 2014; Moser *et al*, 2014). Griffith e colaboradores (2014) descrevem ainda que a quimiocina CCL21 também se liga ao CCR6, a qual é já foi descrita em FRCs (Siegert e Luther, 2012; Luther *et al*, 2011; Turley *et al*, 2010; Mueller e Germain, 2009). Deste modo, é possível que a redução observada na expressão de CCR6 ocorra em consequência da produção de quimiocinas ligantes deste receptor. Embora a literatura relate que FRCs murina produzam as quimiocinas ligantes dos receptores avaliados, não encontramos dados na bibliografia verificada que demonstre a produção destas quimiocinas pelas DNCs. No entanto, de acordo com nossos resultados Malhotra e colaboradores (2012) ao avaliar perfis transcricionais de células estromais de linfonodos murino, relataram que FRCs e DNCs apresentam relativa semelhança transcricional. Portanto, seria interessante avaliar quais quimiocinas são produzidas pelas FRCs e DNCs humanas nesse contexto alogênico, ainda não reportado na literatura.

Nossos dados evidenciam que FRCs e DNCs possuem a capacidade de influenciar a expressão de moléculas de *homing* em linfócitos. Entretanto, é apropriado lembrar que a expressão de receptores de quimiocinas é flexível. Inicialmente as quimiocinas são capazes de estimular sua expressão e posteriormente diminuir, o que permite que as células respondam a outras quimiocinas de acordo com o estímulo. Portanto, a hipótese de que FRCs e DNCs secretem diferentes quimiocinas de forma diferencial poderia influenciar e até modular a resposta de linfócitos alogênicos.

Ebert e McColl (2002) ao avaliarem a expressão de CCR5 e CCR6 em linfócitos T durante a reação mista leucocitária descreveram que linfócitos T CD4 ativados, neste contexto alogênico, apresentam maior expressão de CCR5 e CCR6 quando comparados aos linfócitos ativados em cultura singênica, mas o mesmo não ocorre em linfócitos T CD8. Estes autores ainda relataram que estes receptores estão envolvidos com o fenótipo de células ativadas/memória. Considerando este achado, observamos que os níveis de expressão de ki-67, CXCR4, CCR5 e CCR6 em linfócitos estimulados derivados do SP e LN, apresentaram importantes diferenças. A origem destes linfócitos justifica esta dissimilaridade, uma vez que distintas populações celulares e a frequência destas são diferencialmente encontradas no LN e SP. A frequência das subpopulações de linfócitos

(como, Th1, Th17, células de memória, linfócitos B, entre outras) presente no LN e no SP é diferente, o que não foi verificado por este estudo.

Em conjunto, nossos resultados mostram que FRCs e DNCs humanas atendem a todos os critérios mínimos propostos pela ISCT para serem consideradas CTMs; além disso, estas células são similares às CTMs encontradas na medula óssea quanto a capacidade de reduzir a proliferação de linfócitos alogênicos (Aggarwal e Pittenger, 2005). Sugerimos que FRCs e DNCs podem influenciar a migração de linfócitos alogênicos conforme o contexto em que estão envolvidas, entretanto o conhecimento deste potencial deve ser investigado mais profundamente.

8 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, isolamos e caracterizamos as células estromais obtidas de LNs humanos. Mostramos as similaridades das FRCs e DNCs com as CTMs, comprovando que todos os critérios sugeridos pela ISCT são atendidos. Demonstramos também que assim como as CTMs, as FRCs e DNCs apresentam um efeito antiproliferativo sobre os linfócitos alogênicos *in vitro*. Ainda, observamos a influência destas células sobre as moléculas de *homing* em linfócitos alogênicos estimulados *in vitro*. Portanto, contribuimos para a descrição das FRCs e DNCs derivadas de LN humanos e sua influência sobre linfócitos alogênicos derivados de sangue periférico ou linfonodo. Finalizando, vale ressaltar a importância desse trabalho visto que estudos envolvendo FRCs e DNCs humanas são escassos.

9 ANEXO

9.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FRCs SEGUNDO OS MARCADORES, QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS

Tabela. Caracterização das FRCs segundo os marcadores, quimiocinas e citocinas secretadas. FRCs foram classificadas segundo a espécie, marcadores superficiais ou intracelulares, induzíveis, excludentes

da presença de outras células, secreção de quimiocinas regulares ou induzíveis e citocinas, listados por ordem de publicação. **Abreviações:** Linfonodo murino (MLN); Tonsilas Humanas (HT); Linfonodo primata não humano (NHPLN); Linfonodo murino e humano (MHLN).

Ano – Autor (Espécie)	Marcadores				Quimiocinas		Citocinas
	Superficiais	Intracelulares	Excludentes	Induzíveis	Regulares	Induzíveis	
2004-Katakai e colaboradores (MLN)	CD44, gp38, CD106	ER-TR7	CD54	CD11b/CD18, CD16,CD31, CD32, CD35, MHCII, LYVE1	CCL2, CXCL12, CX3CL1	CCL4, CCL5, CCL20, CXCL10	IL6, IL7, IL15
2006- Hara e colaboradores (MLN)	gp38, CD106	ER-TR7	-----	-----	-----	CXCL16	IL7, IL15
2007- Amé-Thomas e colaboradores (HT)	CD73, CD90, CD105	-----	CD54 CD106	CD21, CD23, CD35, CD45	CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL12	CCL19	-----
2007- Link et al (MLN)	gp38, αSMA, desmina, CD157, PDGFRα, PDGFRβ, CD54, CD106, LTβR, TNF-R	ER-TR7	-----	CD21, CD31, CD35 CD45, LYVE-1	CCL19, CCL21	-----	IL7
2009- Mueller e Germain (Review)	gp38, PDL1	VEGF, ER-TR7	-----	CD45, CD31, CD21, CD35, C4, CD16, CD23, CD32, CD157, Mfge8	CCL19, CCL21	-----	IL7
2009- Steele e colaboradores (NHPLN)	gp38, p75NGFR, TTG, CD54, CD106, CD157, LTβR, PDGFRα, PDGFRβ, αSMA, TNFR1, Meca79, desmina	ER-TR7	-----	-----	CCL19, CCL21, CXCL16, CCL2/MCP1	-----	IL7, IL6
2010- Turley e colaboradores (Review)	gp38, PDL1	DEAF1	-----	CD31	CCL19, CCL21	-----	IL7
2011- Khan e colaboradores (MLN)	gp38, PDL1	-----	iNOS	CD45, CD31	CCL19, CCL21	-----	IL7
2011- Luther e colaboradores (Review)	gp38, CD54, CD106, CD157, PDGFRαβ, LTβR, TNFR1, desmina, αSMA	VEGF	-----	CD21, CD31, CD35, CD45, C4, Mfge8	CCL19, CCL21	CCL2, CCL4, CCL5, CXCL12, CXCL16, CX3CL1	IL7, IL6
2011- Link e colaboradores (MHLN)	gp38, CD54, CD106, CD157, PDGFRαβ, LTβR, desmina, αSMA	ERTR7	-----	CD31, CD35, CD45	CCL19, CCL21	-----	IL7
2011- Onder e colaboradores (MLN)	gp38	-----	-----	CD31, CD45	CCL19, CCL21	-----	IL7
2011- Fletcher e colaboradores (a) (MHLN)	gp38, PDGFα, CD54, CD106	VEGF	-----	CD45, CD31	CCL19, CCL21 CXCL9, CXCL10	-----	IL7
2011-Fletcher e colaboradores (b) (Revisão)	gp38, PDGFα, CD54, CD106	VEGF	-----	CD45, CD31	CCL19, CCL21, CXCL12 (SDF1)	-----	IL7
2011- Frontera e colaboradores (MLN)	CD54, CD106, PDGFα, CD141	JAMC	-----	CD45, CD31, LYVE1	CCL21	-----	-----
2011- Siegert e colaboradores (MLN)	gp38	iNOS	-----	CD45, CD35, CD31, EpCAM	CCL19, CCL21	-----	IL7

Continua...

...continuação

Ano – Autor (Espécie)	Marcadores				Quimiocinas		Citocinas
	Superficiais	Intracelulares	Excludentes	Induzíveis	Regulares	Induzíveis	
2011- Lukacs-Kornek e colaboradores (MLN)	gp38, PDL1, INFGR1, TNFR1, TNFR2	NOS2, IDO	-----	CD45, CD31	CCL19, CCL21	-----	-----
2012- Zeng e colaboradores (NHPLN)	Desmina	-----	-----	CD35, CD21	-----	-----	-----
2012- Siegert e Luther (Revisão)	gp38, PDL1	COX2, AIRE, DEAF1, NO	iNOS, MHCII, IDO, CD80	CD21, CD35, CD31	CCL19, CCL21	-----	IL7
2012- Graw e colaboradores (MLN)	-----	-----	-----	-----	CCL19, CCL21	-----	-----
2012- Onder e colaboradores (MLN)	gp38	-----	-----	CD31, CD45	CCL19, CCL21	-----	IL7
2012- Hess e colaboradores (MLN)	gp38, CD106, MadCAM1	RankL	-----	CD31, CD45	-----	-----	IL7
2012- Malhotra e colaboradores (MLN)	gp38, CD140a	VEGFA-C, ANGPTL2-4, HGF, GREM1, SERPINF1, caderina11, IFITM-1, Flt3L	-----	CD31, CD45	CXCL14, CCL19, CCL21, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL7	-----	IL34

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, Lukacs-Kornek V, Franz B, Hess PR, Jakus Z, Kuligowski M, Fletcher AL, Elpek KG, Bellemare-Pelletier A, Sceats L, Reynoso ED, Gonzalez SF, Graham DB, Chang J, Peters A, Woodruff M, Kim YA, Swat W, Morita T, Kuchroo V, Carroll MC, Kahn ML, Wucherpfennig KW, Turley SJ. Podoplanin rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity*. 2012 Aug 24;37(2):276-89.
2. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22
3. Alvarenga HG, Marti L. Multifunctional roles of reticular fibroblastic cells: more than meets the eye? *J Immunol Res*. 2014;2014:402038.
4. Amé-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, Guillaudeux T, Lamy T, Fest T, Tarte K. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):693-702.
5. Anderson AO, Shaw S. T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. *Semin Immunol*. 1993 Aug; 5(4):271-82. Review.
6. Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol*. 2012 Sep 12;3:283.
7. Bermejo M, Martín-Serrano J, Oberlin E, Pedraza MA, Serrano A, Santiago B, Caruz A, Loetscher P, Baggiolini M, Arenzana-Seisdedos F, Alcamí J. Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *Eur J Immunol*. 1998 Oct;28(10):3192-204.
8. Bieback K, Wuchter P, Besser D, Franke W, Becker M, Ott M, Pacher M, Ma N, Stamm C, Klüter H, Müller A, Ho AD; START-MSC consortium. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and fiction. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Jul;90(7):773-82.
9. Chyou S, Ekland EH, Carpenter AC, Tzeng TC, Tian S, Michaud M, Madri JA, Lu TT. Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):3887-96.
10. Clark SL Jr. The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope. *Am J Anat*. 1962 May;110:217-57. PubMed PMID: 13879732.

11. Crivellato, E., & Mallardi, F. Stromal cell organisation in the mouse lymph node. A light and electron microscopic investigation using the zinc iodide-osmium technique. *Journal of anatomy*.1997; 190, 85–92.
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
13. Ebert LM, McColl SR. Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. 2002 Jan 1;168(1):65-72.
14. English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation. *Curr Drug Deliv*. 2014;11(5):561-71.
15. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 May 1;3(5):a015560.
16. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jan;91(1):19-26.
17. Farr AG, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, Aruffo A. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med*. 1992 Nov 1;176(5):1477-82.
18. Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, Armant M, Turley SJ. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol*. 2011;2:35(a).
19. Fletcher AL, Malhotra D, Turley SJ. Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm. *Trends Immunol*. 2011 Jan;32(1):12-8(b).
20. Frontera V, Arcangeli ML, Zimmerli C, Bardin F, Obrados E, Audebert S, Bajenoff M, Borg JP, Aurrand-Lions M. Cutting edge: JAM-C controls homeostatic chemokine secretion in lymph node fibroblastic reticular cells expressing thrombomodulin. *J Immunol*. 2011 Jul 15;187(2):603-7.
21. Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M. Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 1997 Sep;20(1):10-8.

22. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012 Feb;18(2):128-34.
23. Gonzalez RF, Dobbs LG. Purification and analysis of RTI40, a type I alveolar epithelial cell apical membrane protein. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 8;1429(1):208-16.
24. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.
25. Hara T, Katakai T, Lee JH, Nambu Y, Nakajima-Nagata N, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymphnode fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. *Int Immunol*. 2006 Feb;18(2):301-11.
26. Hess E, Duheron V, Decossas M, Lézot F, Berdal A, Chea S, Golub R, Bosisio MR, Bridal SL, Choi Y, Yagita H, Mueller CG. RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation. *J Immunol*. 2012 Feb 1;188(3):1245-54.
27. Huang S, Leung V, Peng S, Li L, Lu FJ, Wang T, Lu W, Cheung KM, Zhou G. Developmental definition of MSCs: new insights into pending questions. *Cell Reprogram*. 2011 Dec;13(6):465-72.
28. Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr;294(4):F758-67.
29. Junt T, Scandella E, Ludewig B. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2008 Oct;8(10):764-75. doi: 10.1038/nri2414. Review.
30. Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):783-95.
31. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):709-16.
32. Khan O, Headley M, Gerard A, Wei W, Liu L, Krummel MF. Regulation of T cell priming by lymphoid stroma. *PLoS One*. 2011;6(11):e26138.

33. Link A, Hardie DL, Favre S, Britschgi MR, Adams DH, Sixt M, Cyster JG, Buckley CD, Luther SA. Association of T-zone reticular networks and conduits with ectopic lymphoid tissues in mice and humans. *Am J Pathol*. 2011 Apr;178(4):1662-75.
34. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*. 2007 Nov;8(11):1255-65.
35. Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, Collier AR, Turley SJ. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol*. 2011 Sep 18;12(11):1096-104.
36. Luther SA, Vogt TK, Siegert S. Guiding blind T cells and dendritic cells: A closer look at fibroblastic reticular cells found within lymph node T zones. *Immunol Lett*. 2011 Jul;138(1):9-11.
37. Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, Lukacs-Kornek V, Tayalia P, Gonzalez SF, Elpek KG, Chang SK, Knoblich K, Hemler ME, Brenner MB, Carroll MC, Mooney DJ, Turley SJ; Immunological Genome Project Consortium. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol*. 2012 Apr 1;13(5):499-510.
38. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 2004 Feb;25(2):75-84. Review.
39. Mueller SN, Ahmed R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev*. 2008 Aug; 224:284-94.
40. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Sep;9(9):618-29.
41. Munoz MA, Biro M, Weninger W. T cell migration in intact lymph nodes in vivo. *Curr Opin Cell Biol*. 2014 Oct;30:17-24.
42. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, Tawonsawatruk T, Lazzari L, Soo C, Péault B. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Oct 25.
43. Navarro-Núñez L, Langan SA, Nash GB, Watson SP. The physiological and pathophysiological roles of platelet CLEC-2. *Thromb Haemost*. 2013 Jun;109(6):991-8.

44. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A*. 2013 Jan;83(1):48-61.
45. Normanton M, Alvarenga H, Hamerschlak N, Ribeiro A, Kondo A, Rizzo LV, Marti LC. Interleukin 7 plays a role in T lymphocyte apoptosis inhibition driven by mesenchymal stem cell without favoring proliferation and cytokines secretion. *PLoS One*. 2014 Sep 3;9(9):e106673.
46. Onder L, Narang P, Scandella E, Chai Q, Iolyeva M, Hoorweg K, Halin C, Richie E, Kaye P, Westermann J, Cupedo T, Coles M, Ludewig B. IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4675-83.
47. Onder L, Scandella E, Chai Q, Firner S, Mayer CT, Sparwasser T, Thiel V, Rüllicke T, Ludewig B. A novel bacterial artificial chromosome-transgenic podoplanin-cre mouse targets lymphoid organ stromal cells in vivo. *Front Immunol*. 2011;2:50.
48. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res*. 2008 Sep-Oct;28(5B):2997-3006.
49. Siegert S, Huang HY, Yang CY, Scarpellino L, Carrie L, Essex S, Nelson PJ, Heikenwalder M, Acha-Orbea H, Buckley CD, Marsland BJ, Zehn D, Luther SA. Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One*. 2011;6(11):e27618.
50. Siegert S, Luther SA. Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Front Immunol*. 2012 Sep 11;3:285.
51. Slukvin II, Vodyanik M. Endothelial origin of mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*. 2011 May 1;10(9):1370-3.
52. Sobocinski GP, Toy K, Bobrowski WF, Shaw S, Anderson AO, Kaldjian EP. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration. *BMC Immunol*. 2010 Aug 17;11:42.
53. Steele KE, Anderson AO, Mohamadzadeh M. Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses. *Immunotherapy*. 2009 Mar;1(2):187-97.
54. Susan Chyou, Eric H. Ekland, April C. Carpenter, Te-Chen Tzeng, Sha Tian, Michael Michaud, Joseph A. Madri and Theresa T. Lu. Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J. Immunol* 2008;181:3887–3896.

55. Thomazy VA, Vega F, Medeiros LJ, Davies PJ, Jones D. Phenotypic modulation of the stromal reticular network in normal and neoplastic lymph nodes: tissue transglutaminase reveals coordinate regulation of multiple cell types. *Am Pathol*. 2003 Jul;163(1):165-74.
56. Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):813-25.
57. Tykocinski M, Schinella RA, Greco MA. Fibroblastic reticulum cells in human lymph nodes. An ultrastructural study. *Arch Pathol Lab Med*. 1983 Aug;107(8):418-22.
58. Vanderbilt JN, Allen L, Gonzalez RF, Tigue Z, Edmondson J, Ansaldi D, Gillespie AM, Dobbs LG. Directed expression of transgenes to alveolar type I cells in the mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Sep;39(3):253-62.
59. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2007 Jan 15;96(1):1-5. Epub 2006 Dec 19.
60. Yip L, Su L, Sheng D, Chang P, Atkinson M, Czesak M, Albert P R, Collier A, Turley S J, Fathman C G, Creusot R J. Deaf1 isoforms control the expression of genes encoding peripheral tissue antigens in the pancreatic lymph nodes during type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2009 Set; 10(9): 1026–1033.
61. Zimmer G, Lottspeich F, Maisner A, Klenk HD, Herrler G. Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem J*. 1997 Aug 15;326 :99-108.

*** De acordo com:**

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

APÊNDICES

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificar e isolar células-tronco estromais de linfonodos humanos.

Pesquisador: Luciana Cavaleiro Marti

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 07768712.4.0000.0071

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

Patrocinador Principal: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 721.550

Data da Relatoria: 08/07/2014

Apresentação do Projeto:

Os linfonodos são cerca de 400 pequenos órgãos distribuídos pelo corpo e que tem papel importante na tolerância e resposta imunológica. Dentre a variedade de células que compõe a estrutura deste pequeno órgãos as células estromais embora pouco estudadas parece ter papel importante na modulação das respostas imunes e na tolerância periférica. Em contrapartida as células estromais derivadas de medula óssea tem seu papel na imunomodulação e vem sendo utilizada em ensaio clínico de doença do enxerto vs hospedeiro. Nossa hipótese é que as células mesenquimais derivadas de medula óssea tenham papel cognato as ELs quando em presença de uma resposta inflamatória já em curso, interferindo na modulação destas respostas, como também na sobrevivência e tráfego de diferentes células do sistema imune. O aumento do conhecimento da biologia e da função de células do estroma presentes nos linfonodos pode proporcionar vias de valor terapêutico o tratamento de doenças como a DECH, doenças auto-imunes e infecções.

Objetivo da Pesquisa:

Isolar e caracterizar as ELs de linfonodos humanos, mais precisamente células reticulares

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

Continuação do Parecer: 721.550

fibroblásticas (FRC), comparar as características encontradas nestas ELs com as características das MSCs humanas derivadas de medula óssea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para o doador uma vez que os linfonodos de cadáver são removidos descartados antes do transplante do órgão. O risco da remoção de linfonodo para realização do exame anatomopatológico não será alterado pela doação de parte do linfonodo enviado ao exame. Não há benefícios para o doador. Apenas a contribuição científica que poderá gerar novo conhecimento nesta área.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa já aprovado pelo CEP HIAE. O pesquisador entrou com uma emenda ao CEP solicitando a inclusão de amostra de sangue de paciente coletada pelo laboratório clínico que esteja excedente no projeto de pesquisa devido ao fato de que as amostras de linfonodos isoladas dos linfonodos apresentarem características diferentes das células isoladas de sangue periférico. Para isso o TCLE foi modificado de acordo com o solicitado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo.

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado o seguinte documento:

1-Termo 2 (Linfonodo-biopsia) - Versão 3 datada de 16 de Junho de 2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP

Continuação do Parecer: 721.550

SAO PAULO, 17 de Julho de 2014

Assinado por:
Fabio Pires de Souza Santos
(Coordenador)

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificar e isolar células-tronco estromais de linfonodos humanos.

Pesquisador: Luciana Cavaleiro Marti

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 07768712.4.0000.0071

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

Patrocinador Principal: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 469.885

Data da Relatoria: 06/11/2013

Apresentação do Projeto:

O Projeto aprovado pelo CEP do hospital Einstein só foi encaminhado à Comissão de ética do HCFMUSP em função da executante realizar pós graduação na instituição

Objetivo da Pesquisa:

Isolar Células estromais linfóides (ELs) de linfonodos periféricos e mesentéricos e caracterizar tanto por citometria de fluxo quanto por diferenciação nas 3 linhagens mesodérmicas usando as células mesenquimais (MSC) de medula óssea como controle.2- Identificar quais receptores de quimiocinas são expressos pelas ELs em comparação com as MSC e quais quimiocinas são secretadas por ambas em condições similares (repouso ou mediante á estímulo inflamatório).3-Verificar a influência das ELs de linfonodos periféricos e mesentéricos na sobrevivência e expressão de moléculas de homing por linfócitos e comparar a mesma situação utilizando as MSC de medula óssea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem elaborado

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 469.885

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE esta claro e foi aprovado pelo CEP do Hospital Einstein

Recomendações:

Projeto de pesquisa é a dissertação de mestrado da aluna Heliene Gonçalves

Alvarenga, a qual faz parte do Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo a qual o CEP Einstein solicitou a inclusão com co-participante no projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendencias

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2013

Assinador por:

Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Review Article

Multifunctional Roles of Reticular Fibroblastic Cells: More Than Meets the Eye?

H. G. Alvarenga^{1,2} and L. Marti^{1,2}

¹ Experimental Research, Hospital Israelita Albert Einstein, Avenida Albert Einstein 627, 05152 000 São Paulo, SP, Brazil

² Programa de Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Av. Dr. Arnaldo, 455, 01418 200 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to L. Marti; luciana.marti@einstein.br

Received 4 February 2014; Revised 25 March 2014; Accepted 25 March 2014; Published 16 April 2014

Academic Editor: Ethan M. Shevach

Copyright © 2014 H. G. Alvarenga and L. Marti. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fibroblastic reticular cells (FRCs) are stromal cells found in secondary lymphoid organ. Despite its structural function in the lymph nodes being well established, recent studies indicate that the FRCs also play a key role in immunological processes, associated with cell transit, immune response, and cells activation quality, and contribute to peripheral tolerance. To this end, we focus this review on lymph nodes FRC characterization and discuss functional aspects such as production of cytokines and chemokines and their involvement in the immune response, seeking to establish whether certain subsets have a more functional specialization.

1. Introduction

Fibroblastic reticular cells (FRCs) are stromal cells of mesodermal origin which are found in secondary lymphoid organs (SLO). The most studied are the FRCs located in the lymph nodes (LN). They comprise distinct subpopulations distributed in the cortical and medullary regions. Some FRCs are found in the T cell zones and were therefore named T cell zone fibroblastic reticular cells (TRCs). The FRCs structural function in the lymph nodes is well established. Yet recent studies indicate that FRCs also participate in the regulation of immune responses and in the maintenance of peripheral tolerance. The cellular traffic in SLO and the activation of specific lymphocyte populations can be influenced by FRCs and consequently also the quality and intensity of the immune responses [1–3]. Nevertheless, this is a relatively new research area and many of the pathways and mechanisms of cellular interactions between FRCs and neighboring cells are not yet known and need further investigation.

The morphological variations among FRCs and the diversity of their functions in the immune response have been described [4–6]. However, so far, a clear match between the described FRC phenotypes and their respective functions has not been established. A further complication to the issue is that mouse FRCs exhibit, in addition to classically known cell

surface markers, several other distinct specific markers for FRCs subtypes.

We review herein the studies on phenotypic characterization of FRCs isolated from murine and human lymph nodes and on the selective synthesis of chemokines and cytokines as well as interactions with other cells. Recent advances in understanding the functional diversity of FRC subpopulations are highlighted.

2. Fibroblastic Reticular Cells Morphology

Fibroblastic reticular cells (FRCs) are present in the cortical and medullary regions of lymph nodes and can be fusiform, stellate, or highly elongated depending on their localization [7, 8]. Virtually all FRCs contain in their cytoplasm structures consisting of a network of intertwined tubules and cisterns. These complex organelles form labyrinths that open on the cell surface by numerous small orifices, so that the lumen of this tubular system is continuous with the extracellular matrix lattice (Figure 1).

The FRC establishes close contact with each other and also with various other cell types such as lymphocyte, lymphoblast, plasma cell, and interdigitating and follicular dendritic cells (FDC). When FRCs are in contact, their

FIGURE 1: Schematic representation of FRCs. They are spatially arranged so as to delimit a conduit channel that drives soluble molecules. Other structures evidenced are the FRC intracellular cytoplasmic channels, through which antigens are transported from the lymph to the nearby-lying antigen-presenting cells.

plasma membranes remain separated by a space of about 20 nm, forming an intercellular channel through which driving soluble molecules are transported [8].

More precisely, FRCs organization generates a conduit system between them; these conduits are called reticular fiber network that are responsible for transporting soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in T cell area of the lymph node. This structure produces the infrastructure necessary, at least for the first wave of antigen presentation, which takes place few minutes after soluble antigen injection in a subcutaneous site of an animal model as described by Sixt et al. article [9].

In the lymph nodes cortical areas, FRCs are situated close to the subcapsular sinus, according to their antigen-capturing function. The cortical FRCs are polarized: soluble molecules (antigens, cytokines, neuropeptides, lipids, microbial products) are collected at the FRC cell side facing the subcapsular lumen and released at an area in contact with lymphocytes and follicular dendritic cells (FDC). The intracellular channels of FRCs are the organelles that facilitate the transport of antigen from the afferent lymph to the FDC (Figure 1) [8, 10].

3. Phenotypic Diversity

FRC identification is based on a set of markers that are expressed or exclude other cells types. Murine FRCs are basically characterized by the expression of gp38 (a known marker of lymphatic endothelium), absence of CD31 (an endothelial cell marker), as well as the secretion of the chemokines CCL19 and CCL21 and of the cytokine IL-7. However, in the last decade several studies have identified additional markers for these cells present in lymph nodes of different species (Table 1). Although a variety of newer markers may assist the identification of FRCs and their subsets, there is no consensus on the correspondence among the subsets described by several authors.

As an attempt to characterize FRCs in mouse lymph nodes (LN) several fibroblastic cell lines were derived. The cells characterized as FRCs expressed CD44, CD106, and gp38, intracellular ER-TR7, and did not express CD11b/CD18, CD16, CD31, CD32, CD35, LYVE-1, and MHC-II [11].

However it was soon recognized that FRCs are heterogeneous with respect to their morphology and location. Subsets of cells were described in distinct locations of mouse LN,

namely, TRC, pericytes and two endothelial subsets BECs (blood endothelial cells) and LECs (lymphatic endothelial cells) that should be taken into consideration, since they need to be excluded when FRCs are the focus of the investigation. Each cell type expresses a distinct combination of the surface markers gp38, CD31, and CD157 to differentiate them [6]. Of note, in this classification, gp38, hitherto considered FRCs hallmark, is not expressed by pericytes and BECs (blood endothelial cells) whereas CD31 is expressed by the endothelial cells (BEC and LEC). The marker CD157 (stromal-like lymphoid marker BP-3) is not expressed by LECs but is present on the other three cell types. However, CD157 was later found to be expressed also by stromal cells in tertiary lymphoid tissues at sites of acute inflammation or tumors [6].

Additional studies confirmed that gp38 expression is not unique to mouse TRCs and LECs as it is also expressed by yet another FRC subset found below the LN capsule, known as marginal zone reticular cells (MRCs). Unlike TRCs, the MRCs express CXCL13, MAdCAM-1, and high levels of RANK-L. Detailed studies on the expression of multiple surface markers by the different sets of FRCs were done and the three main FRCs subsets are summarized in Figure 2 [2, 5, 6, 12, 13]. In addition new markers specific for TRCs have been described and compiled [4–6].

Turley et al. and Luther et al. offered yet another classification for mouse FRCs, only the TRCs that differ from the endothelial subsets BECs and LECs [4, 5, 14]. Although the classification was based on gp38 and CD31 expression, other markers such as PDL1 and IFN-inducible iNOS expression were found in TRCs; in addition, the expression of a transcriptional regulator, called deformed epidermal autoregulatory factor 1 (DEAF1), was also present [3, 14, 15].

4. FRC in Humans and Primates

Stromal cells from human tonsils with FRC characteristics were also isolated. Tonsils FRCs were compared to bone marrow stromal cells, regarding interactions with B cells. This study showed that both cell types exerted a similar and comparable antiapoptotic effect on B cells. However, after treatment with TNF (tumor necrosis factor)/LT (lymph toxin) either cell type increased the survival of a B cell tumor. While not able to induce purified B cell proliferation, they induced high rates of proliferation in tumor cells [16].

TABLE 1: FRC characterization markers. FRC was classified by species, surface or intracellular makers, inducible markers and ones that exclude other cells presence, and chemokines and cytokines secretion, listed in time order of publishing.

Publication year—author (species)	Markers				Chemokines		Cytokines
	Surface	Intracellular	Inducible	Excluding	Regular	Inducible	
2004—Katakai et al. (a) [11] (MLN)	CD44, gp38, CD106	ER-TR7	CD54	CD11b/CD18, CD16,CD31, CD32, CD35, MHCII, LYVEI	CCL2, CXCL12, CX3CL1	CCL4, CCL5, CCL20, CXCL10	IL6, IL7, IL15
2004—Katakai et al. (b) [22] (MLN)	—	ER-TR7	—	—	—	—	—
2005—Sixt et al. [9] (MLN)	gp38, α SMA, desmin	ER-TR7	—	—	—	—	—
2006—Bajénoff et al. [23] (MLN)	Desmin, CD106, CD54	ER-TR7	—	—	CCL19, CCL21, CXCL12 (SDF-1)	—	—
2006—Hara et al. [25] (MLN)	gp38, CD106	ER-TR7	—	—	—	CXCL16	IL7, IL15
2007—Amé-Thomas et al. [16] (HT)	CD73, CD90, CD105	—	CD54 CD106	CD21, CD23, CD35, CD45	CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL12	CCL19	—
2007—Link et al. [4] (MLN)	gp38, α SMA, desmin, CD157, PDGFR α , PDGFR β , CD54, CD106, LT β R, TNF-R	ER-TR7	—	CD21, CD31, CD35 CD45, LYVE-1	CCL19, CCL21	—	IL7
2009—Roozendaal et al. [30] (MLN)	gp38	ER-TR7	—	—	—	—	—
2009—Mueller and Germain [12] (review)	gp38, PDL1	VEGF, ER-TR7	—	CD45, CD31, CD21, CD35, C4, CD16, CD23, CD32, CD157, Mfge8	CCL19, CCL21	—	IL7
2009—Steel et al. [17] (NHPLN)	gp38, p75NGFR, TTG, CD54, CD106, CD157, LT β R, PDGFR α , PDGFR β , α SMA, TNFR1, Meca79, desmin	ER-TR7	—	—	CCL19, CCL21, CXCL16, CCL2/MCP1	—	IL7, IL6
2010—Turley et al. [14] (review)	gp38, PDL1	DEAF1	—	CD31	CCL19, CCL21	—	IL7
2011—Khan et al. [15] (MLN)	gp38, PDL1	—	iNOS	CD45, CD31	CCL19, CCL21	—	IL7
2011—Luther et al. [5] (review)	gp38, CD54, CD106, CD157, PDGFR α , LT β R, TNFR1, desmin, α SMA	VEGF	—	CD21, CD31, CD35, CD45, C4, Mfge8	CCL19, CCL21	CCL2, CCL4, CCL5, CXCL12, CXCL16, CX3CL1	IL7, IL6
2011—Link et al. [6] (MHLN)	gp38, CD54, CD106, CD157, PDGFR α , LT β R, desmin, α SMA	ERTR7	—	CD31, CD35, CD45	CCL19, CCL21	—	IL7
2011—Onder et al. [3] (MLN)	gp38	—	—	CD31, CD45	CCL19, CCL21	—	IL7
2011—Fletcher et al. (a) [20] (MHLN)	gp38, PDGFR α , CD54, CD106	VEGF	—	CD45, CD31	CCL19, CCL21 CXCL9, CXCL10	—	IL7

TABLE 1: Continued.

Publication year—author (species)	Markers				Chemokines		Cytokines
	Surface	Intracellular	Inducible	Excluding	Regular	Inducible	
2011—Fletcher et al. (b) [21] (review)	gp38, PDGFR α , CD54, CD106	VEGF	—	CD45, CD31	CCL19, CCL21, CXCL12 (SDF1)	—	IL7
2011—Frontera et al. [37] (MLN)	CD54, CD106, PDGFR α , CD141	JAMC	—	CD45, CD31, LYVE1	CCL21	—	—
2011—Siegert et al. [2] (MLN)	gp38	iNOS	—	CD45, CD35, CD31, EpCAM	CCL19, CCL21	—	IL7
2011—Lukacs-Kornek [34] (MLN)	gp38, PDL1, INFGRI, TNFR1, TNFR2	NOS2, IDO	—	CD45, CD31	CCL19, CCL21	—	—
2012—Zeng et al. [19] (NHPLN)	Desmin	—	—	CD35, CD21	—	—	—
2012—Siegert and Luther [33] (review)	gp38, PDL1	COX2, Aire, DEAF1, NO	iNOS, MHCII, IDO, CD80	CD21, CD35, CD31	CCL19, CCL21	—	IL7
2012—Graw and Regoes [26] (MLN)	—	—	—	—	CCL19, CCL21	—	—
2012—Onder et al. [29] (MLN)	gp38	—	—	CD31, CD45	CCL19, CCL21	—	IL7
2012—Hess et al. [13] (MLN)	gp38, CD106, MadCAM1	RankL	—	CD31, CD45	—	—	IL7
2012—Malhotra et al. [28] (MLN)	gp38, CD140a	VEGFA and C, ANGPTL2 and 4, HGF, GREM1, SERPINF1, cadherin-11, IFITM-1, Flt3L	—	CD31, CD45	CXCL14, CCL19, CCL21, CXCL13 CXCL12, CCL2, CCL7	—	IL34
2012—Acton et al. [24] (MLN)	gp38	—	—	CD31	CCL19, CCL21	—	—
2013—Chai et al. [31] (MLN)	gp38, α SMA,	ER-TR7, NO	—	CD31, CD45	CCL19, CCL21	—	IL-7
2014—Yang et al. [32] (MLN)	gp38, PDGFR α , LT β R, α SMA	VEGF, iNOS, VEGF, MyD88	—	CD31, CD45, LYVE-1	CCL19, CCL21	—	IL-7

Murine lymph node (MLN); human tonsils (HT); nonhuman primate lymph node (NHPLN); murine and human lymph node (MHLN).

A study on viral pathogenesis in nonhuman primates by Steel et al. identified two other FRC markers besides those described in the mouse by Link et al. [6, 17]. The authors observed that the previously described FRC subsets were positive for a TNF receptor (TNFR) family member known as p75 NGFR and for transglutaminase (TTG) in several species of nonhuman primates. They hypothesized that p75 NGFR expression could be related to a mechanism whereby the nervous system regulates immune responses via FRCs. In addition, they discuss that TTG has previously been shown by Thomazy et al. to play a role in phenotypic regulation of human lymph node FRC [17, 18].

Thomazy et al. compared functional aspects and TTG expression between LN obtained from normal individuals and from lymphoma patients. Basically, when the FRC network is open, migration of cells and molecules around the follicle occurs at high turnover; this condition is accompanied by germinal center expansion and by increased expression

of TTG in the FRCs of the subcapsular sinus and cortex. In contrast, when the FRC network is tighter, migration of cells from the subcapsular sinus is reduced and TTG expression is limited to the sinus. In the various lymphomas, high TTG levels were found in the LN stromal cell suggesting that cell migration is altered in these conditions [18].

Not only tumors but also infections with SIV in nonhuman primates or HIV in humans determine the loss of the fibroblast and FRCs network integrity in LN [19].

Fletcher et al. are the sole investigators who made use in humans of murine consensus FRC markers such as gp38, CD31, CD45, CD54, CD106, and PDGFR, to compare the stromal composition between mouse and humans. They reported that the human lymph node stromal cells were marked similar to the murine ones. Using the same murine methods and markers they were able to isolate and cultivate human stromal cell subsets of mesenteric and elsewhere

FIGURE 2: Schematic representation of lymph node and cells classification [4–6]: (A) FRC in the T cell zone (TRC)– gp38+ CD157+ CD31–. (B) FRC around blood vessels (pericytes) gp38– CD157+ CD31–. (C) FRC in the marginal zone (MRC) gp38+ CD31– CXCL13+. (D) Blood vessel endothelial cells (BEC) gp38– CD157+ CD31+. (E) Lymphatic endothelial cells (LEC) gp38+ CD157– CD31+ (E).

located LN. They found that similar numbers of cells could be isolated from skin-draining and mesenteric LN; however, the stromal composition significantly differed. The FRCs, which grow throughout the T cell zone, were present at greater frequency and were more numerous in skin-draining than mesenteric lymph nodes [20, 21].

Despite the rapid progress in recent years, FRCs characterization is fragmented, and there is still no consensus on the subset markers. In addition, it is not clear whether FRC subpopulations can indeed be classified by the expression of a set of several markers or whether variations in expression are determined by activation status or by their localization in the LN. The definition of FRC phenotypic diversity in murine and human would assess whether these cells have similar morphology combined or not with distinct functions and expression patterns.

5. Functional Diversity

Although originally considered as supporting cells in the lymph node, in recent decades it has been suggested that FRC may have additional functions, such as support for lymphocytes migration and survival, activation and control of the immune response as well as a role in peripheral tolerance [21].

Several studies have been conducted in the last decade on the possible functions exerted by FRCs, but a thorough understanding awaits a clear definition of the existing phenotypic and functional FRC subpopulations. Here, we briefly describe the main functions of the FRCs, focusing on their possible immunomodulatory role on immunity and tolerance.

6. FRC Role in Cellular Survival and Migration

Some chemokines can be constantly expressed by FRCs, others maybe expressed at low levels when in idle state and increase the expression in response to stimuli such as TNF- α . Others are expressed only after inflammatory stimuli such as TNF- α , INF- γ , IL-1, or LPS (Table 1).

The reticular network formed by FRCs appears to simultaneously provide mechanical strength to the tissue and space for cell movement, besides acting as a barrier for compartmentalization preventing their disordered interaction or uncontrolled growth [11].

Also, Katakai et al. described a reticular stromal structure in the lymph node cortex, called cortical ridge; the FRCs associated with the cortical ridge may provide a different microenvironment by producing a specialized set of chemokines and adhesion molecules, which would be the attractive destination for immune effector cells in the

FIGURE 3: Chemokine production by FRC and endothelial subsets according to Malhotra et al. [28]. (a) FRCs are able to secrete CCL19, CCL21 the ligand of CCR7, CXCL12 ligand of CXCR4, and CXCL13 ligand of CXCR5. (b) BECs express CXCL12 the ligand of CXCR4. (c) LECs express CCL20 the ligand of CCR6.

FIGURE 4: IL-7 in combination with CCL19 and CCL21 leads naive T cell to survival probably by acting in the imbalance of pro- and antiapoptotic proteins.

cortex [22]. Besides, the fibroblastic reticular cell network regulated naive T cell access to the paracortex and also supported and defined the limits of T cell movement within this domain. These data highlight a central role for stromal microanatomy in cell migration within the LN [23].

Another point that supports a role for FRC in cells migration is the interaction between dendritic cells and FRCs. Acton et al. have described that CLEC-2 engagement with gp38 was necessary for DCs to spread and migrate along stromal surfaces and sufficient to induce the membrane protrusions on DCs [24]. Classically the murine FRCs are known to secrete CCL19, CCL21. These molecules have lymphocyte homing properties that can facilitate the cells encounter [4, 5, 10, 19, 25, 26].

The production of these chemokines is important for the T cell movement in the lymphoid organs. The FRCs surrounding the HEV synthesizes CCL21, which interact with intravascular-lying lymphocytes and promote their transmigration through the HEV. Within the LN adhesion molecules present in the stromal cells are thought to facilitate lymphocyte migration along the reticular network [12, 27].

Malhotra et al. sorted lymph node cells subpopulations and were able to observe that most LECs expressed CCL20, FRCs express large amounts of CCL19 and CCL21, while FRC and BECs expressed CXCL12 only, and FRCs express CXCL13 as shown in Figure 3 [28, 29].

Several groups have reported the cytokine IL-7 as the dominant cytokine synthesized by FRCs. However additional studies have reported production of other cytokines such as IL-6 and IL-15 [4, 5, 11, 17, 27]. Interleukin-7 (IL-7) is a survival factor that acts mainly on naive T cells and also on the development of B cells, DC, and NKT cells [29]. Among its pleiotropic functions IL-7 maintains the T and B cell repertoire and the homeostasis of immune system. TRCs isolated from lymph nodes express ten times more IL-7 than any other lymphoid cell [4].

IL-7 acts in collaboration with chemokines to induce cell survival. Both CCL19 and CCL21 that are also secreted by TRCs are able to induce naive T cells survival (Figure 4). Although presently data suggest that CCL19 and IL-7 are sufficient to maintain T cells survival, it is unclear whether these activities are also shared by other cytokines [4]. Taken

FIGURE 5: While the expression of AIRE by stromal cells is still a controversy, Turley et al. [14] suggest a role for DF1 and DF1-VARI isoforms of DEAF1, on PTAs expression by FRC and the peripheral homeostasis.

together, the results suggest that cell survival maintenance by FRC is not related to a single factor, pathway, or mechanism of action.

During an immune response, within the lymphoid organs, antigen reactive lymphocytes undergo stimulation by the APC, intense proliferation followed by massive (80–90%) cell death as the immune response subsides. The surviving cells differentiate into long-term memory cells that have higher affinity to the antigen. Recent evidence suggests that the lymphoid stromal cell has important roles in both processes, contraction of lymphocyte clones and survival of memory cells. The chemokines CCL19 and CCL21 also promote antigen-induced cell death in activated T cells, suggesting that variations in their relative concentration in the microenvironment may favor either cell death or cell survival. It is also of note that constant stimulation or high doses of CCL19 and CCL21 inhibit the activation, proliferation, and function of T cells [27].

It is important to note that the expression profile of cytokines and chemokines is different between the mesenteric and skin-draining LN-derived FRC. Mesenteric LN-derived FRCs contain reduced expression of several important cytokines and chemokines such as IL-6, IL-7, BAFF, CXCL9, CXCL10, IL-1 receptor accessory protein (IL1RAP), activin receptor IIA, VEGF-A, LIF, and cKIT-ligand [20, 21].

7. Immune Cell Recruitment and Activation

The support network by stromal cells existing in lymphoid organs simultaneously provides mechanical resistance and spaces for immune cells active migration [25]. Conversely the reticular network requires a close and continuous contact with immune system cells [11].

The reticular network and the FRC participate in the selection of antigens that enter the subcapsular sinus. High molecular weight molecules are unable to enter the FRCs conduits lumens and are trapped in the subcapsular sinus

macrophages. Small molecular weight antigens are carried via the conduits to the other pole of the cell to be released and captured by APCs and activate the Ag-reactive T cells. Roozendaal et al. have clarified that the small molecular weight antigens drain passively into the B cell zone through a follicular conduit system that connects the subcapsular sinus with follicular dendritic cells area. Moreover, the follicular conduit network contains CXCL13. Thus, the conduit system provides a source of antigen as well as a possible pathway or network for guiding B cells to the antigen inside the follicles in a similar manner as identified in the paracortex for T cells [30].

IL-7 secreted by FRC promotes APC function and the molecules CCL19 and CCL20 enhance the interaction between dendritic cell (DC) and T cells and stimulate endocytosis and DC antigen presentation (Figure 5). Activated DCs in turn produce CCL3 and CCL4, recruit rare T cell through the FRC driven traffic, and help the immune response priming. All these activities favor the recognition and activation phases of the immune response [5, 12, 27].

Certain molecules, like retinoic acid and vitamin A, are synthesized only by stromal cells from mesenteric LN. The microenvironment appears to influence certain T cell phenotypes. In fact, activated T cells at this location present a gut-homing phenotype since they express $\alpha 4\beta 7$ and CCR9. Mesenteric LN stromal cells are also better at inducing IgA responses. These data suggest that stromal cells can drive the type and quality of immune response in SLO [12].

In addition, Chai et al. have demonstrated that FRC-deficient animals exhibited an impaired resistance to viral infection, demonstrating that LT β R-mediated FRC maturation is critical for the maintenance of the immunocompetence [31].

Another study provides a complete analysis of FRCs number, phenotype, and function associating them with antigen-specific T cell response over time. This study also

demonstrates that FRCs are activated in a process dependent on naive lymphocyte cell number trapping induced by dendritic cells [32].

It is noteworthy that FRC can upregulate not only the migration but also T cells homeostasis, and there are signs that they also influenced T cell differentiation in effector and memory cells. However new investigations are required to establish most of these findings [33].

Together, these data suggest that FRC can contribute to the immune response through the cell traffic regulation in lymph nodes, lymphocyte survival, increasing the antigen presentation quality and possibly driving the type of immune response.

8. Peripheral Tolerance

FRC has been implicated in peripheral tolerance. Some stromal cells express antigens from several peripheral tissues (PTA) and are involved in maintaining peripheral tolerance, especially by deletion of self-reactive T cells [33–37].

The FRCs expressing epidermal derived autoregulatory factor 1 (DEAF1), transcription factor encoded by DEAF1 gene, is responsible for the PTA expression. The DEAF1 controls expression of approximately 300 genes in pancreatic lymph nodes, of which 75% are classified as PTA. Although autoimmune regulator (AIRE) and DEAF1 are similar, they seem to have different manners of action. DEAF1 may have opposing effects on gene transcription in distinct cells [14].

In NOD mice there are at least two DF1 isoforms, canonical DF1 and a DF1 splicing variant (DF1-VAR1). In contrast to DF1, the DF1-VAR1 is unable of entering into the nucleus and regulates PTA transcription (Figure 5). However, it can bind to the DF-1, sequestering it in the cytoplasm and restricting PTA expression. The functional implication of this phenomenon is not yet clear and recent studies suggest that AIRE and DF1 might be inversely expressed in the different stromal populations [20, 21].

The AIRE expression in FRCs is still controversial: while several studies reported AIRE expression in stromal cells, but not specifically in FRC, Siegert et al. reported AIRE expression specifically in FRCs at low levels [20, 25, 34].

The FRC can not only induce tolerance in T cells by the expression of self-antigens but can also limit the T cell response to foreign antigens by expression of suppressive factors leading to direct inhibition of T cells or indirect inhibition by reducing the dendritic cells immunogenicity [33].

In addition to FRC involvement in peripheral tolerance through the self-antigens expression, FRCs are highly responsive to IFN- γ . In response to IFN- γ , FRC increases NOS2 gene transcription encoding the inducible enzyme nitric oxide synthase (iNOS), resulting in nitrite production, which can block T cell cycle progression. These observations place the FRCs as regulators of T cell activation through direct contact with IFN- γ producing T cells [33].

Th2 cells are insensitive to the FRC antiproliferative effect due to a lack in IFN- γ . This is a possible mechanism of

maintaining the integrity of lymphoid tissue, given the ability of Th1 to cause more tissue damage when compared to Th2 [15].

IFN- γ is an important functional regulator of FRC, mainly by the ability of inducing iNOS, IDO-1, and PD-L1 and several molecules involved in antigen presentation. IFN- γ is usually considered the main proinflammatory cytokine, acting in various aspects of the immune response such as depletion of intracellular pathogens by macrophages activation, and increased expression of MHC molecules. However, IFN- γ may also act in immune-regulatory functions, modulating negatively the expression of proteolytic enzymes, reducing recruitment of inflammatory cells, inhibiting Th17 differentiation, and positively regulating the differentiation of regulatory T cells in certain circumstances. Other proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β produced by activated DC also lead to the induction of iNOS in FRC [33, 34].

Siegert and Luther suggest that the inhibitory role of FRCs engages at least two soluble factors, iNOS and cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). COX-2 is the rate-limiting enzyme in the generation of prostanoids including prostaglandin E2 (PGE2), which can either increase or suppress T cell immunity [33].

The effect of FRC in T cell immunity has also been related with PD-L1 expression, which leads to CD8+ T cells modulation. PD-L1 or IDO expression can be induced by IFN- γ . In addition, PD-L1 and IDO play important roles in the development of regulatory T cells and myeloid suppressor cells, which can connect FRC with production, maintenance, or activation of regulatory cells [33].

Many cell types are subtypes of the immune system that suppress or regulate adaptive immunity, such as regulatory T and B cells, dendritic cells, and regulatory M2 activated macrophages [33]. So, it is not surprising that FRCs are positive and negative regulators of adaptive immunity. Similar to other cell types, it remains to be clarified whether there is a subtype of FRC dedicated to this function, or if this feature is dependent on their location, activation state, or phase of the immune response.

In this context, structural cells may act as mechanical and chemical sensors of T cells response in inflamed organs and regulate the populations' dynamics to ensure the maintenance of functional structures.

9. Conclusion

It is clear that the role of FRC is not restricted to structural support, but that they deeply contribute as immune response regulators. However, new studies that investigate their subpopulations and functions related are necessary, as well as differences between different lymph node localization. Most studies dedicated to this subject were developed in murine, and studies in humans that corroborate these findings are required. Another shortcoming of this knowledge is how and much the FRCs may contribute to the development and/or maintenance of inflammatory diseases, autoimmune diseases, or cancer.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are thankful to Professor Ises de Almeida Abrahamssohn that reviewed very carefully this paper. They are also grateful to Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein (SBIBHAE) for all the support.

References

- [1] G. P. Sobocinski, K. Toy, W. F. Bobrowski, S. Shaw, A. Anderson, and E. P. Kaldjian, "Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration," *BMC Immunology*, vol. 17, no. 11, article 42, 2010.
- [2] S. Siegert, H.-Y. Huang, C.-Y. Yang et al., "Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 11, Article ID e27618, 2011.
- [3] L. Onder, E. Scandella, Q. Chai et al., "A novel bacterial artificial chromosome-transgenic podoplanin-cre mouse targets lymphoid organ stromal cells in vivo," *Frontiers in Immunology*, vol. 2, article 50, 2011.
- [4] A. Link, T. K. Vogt, S. Favre et al., "Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells," *Nature Immunology*, vol. 8, no. 11, pp. 1255–1265, 2007.
- [5] S. A. Luther, T. K. Vogt, and S. Siegert, "Guiding blind T cells and dendritic cells: a closer look at fibroblastic reticular cells found within lymph node T zones," *Immunology Letters*, vol. 138, no. 1, pp. 9–11, 2011.
- [6] A. Link, D. L. Hardie, S. Favre et al., "Association of T-zone reticular networks and conduits with ectopic lymphoid tissues in mice and humans," *The American Journal of Pathology*, vol. 178, no. 4, pp. 1662–1675, 2011.
- [7] S. L. Clark Jr., "The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope," *The American Journal of Anatomy*, vol. 110, pp. 217–257, 1962.
- [8] E. Crivellato and F. Mallardi, "Stromal cell organisation in the mouse lymph node. A light and electron microscopic investigation using the zinc iodide-osmium technique," *Journal of Anatomy*, vol. 190, no. 1, pp. 85–92, 1997.
- [9] M. Sixt, N. Kanazawa, M. Selg et al., "The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node," *Immunity*, vol. 22, no. 1, pp. 19–29, 2005.
- [10] A. O. Anderson and S. Shaw, "T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node," *Seminars in Immunology*, vol. 5, no. 4, pp. 271–282, 1993.
- [11] T. Katakai, T. Hara, M. Sugai, H. Gonda, and A. Shimizu, "Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 6, pp. 783–795, 2004.
- [12] S. N. Mueller and R. N. Germain, "Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 9, pp. 618–629, 2009.
- [13] E. Hess, V. Duheron, M. Decossas et al., "RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation," *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 3, pp. 1245–1254, 2012.
- [14] S. J. Turley, A. L. Fletcher, and K. G. Elpek, "The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 12, pp. 813–825, 2010.
- [15] O. Khan, M. Headley, A. Gerard, W. Wei, L. Liu, and M. F. Krummel, "Regulation of T cell priming by lymphoid stroma," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 11, Article ID e26138, 2011.
- [16] P. Amé-Thomas, H. M.-E. Hajjami, C. Monvoisin et al., "Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis," *Blood*, vol. 109, no. 2, pp. 693–702, 2007.
- [17] K. E. Steel, A. O. Anderson, and M. Mohamadizadeh, "Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses," *Immunotherapy*, vol. 1, no. 2, pp. 187–197, 2009.
- [18] V. A. Thomazy, F. Vega, L. J. Medeiros, P. J. Davies, and D. Jones, "Phenotypic modulation of the stromal reticular network in normal and neoplastic lymph nodes: tissue transglutaminase reveals coordinate regulation of multiple cell types," *The American Journal of Pathology*, vol. 163, no. 1, pp. 165–174, 2003.
- [19] M. Zeng, M. Paiardini, J. C. Engram et al., "Critical role of CD4 T cells in maintaining lymphoid tissue structure for immune cell homeostasis and reconstitution," *Blood*, vol. 120, pp. 1856–1867, 2012.
- [20] A. L. Fletcher, D. Malhotra, S. E. Acton et al., "Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells," *Frontiers in Immunology*, vol. 2, article 35, 2011.
- [21] A. L. Fletcher, D. Malhotra, and S. J. Turley, "Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm," *Trends in Immunology*, vol. 32, no. 1, pp. 12–18, 2011.
- [22] T. Katakai, T. Hara, J.-H. Lee, H. Gonda, M. Sugai, and A. Shimizu, "A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells," *International Immunology*, vol. 16, no. 8, pp. 1133–1142, 2004.
- [23] M. Bajénoff, J. G. Egen, L. Y. Koo et al., "Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes," *Immunity*, vol. 25, no. 6, pp. 989–1001, 2006.
- [24] S. E. Acton, J. L. Astarita, D. Malhotra et al., "Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2," *Immunity*, vol. 37, no. 2, pp. 276–289, 2012.
- [25] T. Hara, T. Katakai, J.-H. Lee et al., "A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion," *International Immunology*, vol. 18, no. 2, pp. 301–311, 2006.
- [26] F. Graw and R. R. Regoes, "Influence of the fibroblastic reticular network on cell-cell interactions in lymphoid organs," *PLoS Computational Biology*, vol. 8, no. 3, Article ID e1002436, 2012.
- [27] S. N. Mueller and R. Ahmed, "Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses," *Immunological Reviews*, vol. 224, no. 1, pp. 284–294, 2008.
- [28] D. Malhotra, A. L. Fletcher, J. Astarita et al., "Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks," *Nature Immunology*, vol. 13, no. 5, pp. 499–510, 2012.

- [29] L. Onder, P. Narang, E. Scandella et al., "IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling," *Blood*, vol. 120, pp. 4675–4683, 2012.
- [30] R. Roozendaal, T. R. Mempel, L. A. Pitcher et al., "Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles," *Immunity*, vol. 30, no. 2, pp. 264–276, 2009.
- [31] Q. Chai, L. Onder, E. Scandella et al., "Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity," *Immunity*, vol. 38, no. 5, pp. 1013–1024, 2013.
- [32] C. Y. Yang, T. K. Vogt, S. Favre et al., "Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 1, pp. E109–E118, 2014.
- [33] S. Siegert and S. A. Luther, "Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, article 285, 2012.
- [34] V. Lukacs-Kornek, D. Malhotra, A. L. Fletcher et al., "Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes," *Nature Immunology*, vol. 12, no. 11, pp. 1096–1104, 2011.
- [35] E. P. Kaldjian, J. Elizabeth Gretz, A. O. Anderson, Y. Shi, and S. Shaw, "Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix," *International Immunology*, vol. 13, no. 10, pp. 1243–1253, 2001.
- [36] E. Vega, K. R. Coombes, V. A. Thomazy, K. Patel, W. Lang, and D. Jones, "Tissue-specific function of lymph node fibroblastic reticulum cells," *Pathobiology*, vol. 73, no. 2, pp. 71–81, 2006.
- [37] V. Frontera, M.-L. Arcangeli, C. Zimmerli et al., "Cutting edge: JAM-C controls homeostatic chemokine secretion in lymph node fibroblastic reticular cells expressing thrombomodulin," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 2, pp. 603–607, 2011.

Interleukin 7 Plays a Role in T Lymphocyte Apoptosis Inhibition Driven by Mesenchymal Stem Cell without Favoring Proliferation and Cytokines Secretion

Marília Normanton^{1,5}, Heliene Alvarenga^{1,5}, Nelson Hamerschlak², Andreza Ribeiro³, Andrea Kondo⁴, Luiz Vicente Rizzo¹, Luciana Cavaleiro Marti^{1,5*}

1 Hospital Israelita Albert Einstein, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IEP-AE), São Paulo, SP, Brasil, **2** Hospital Israelita Albert Einstein, Bone Marrow Transplant Program, São Paulo, SP, Brasil, **3** Hospital Israelita Albert Einstein, Oncology Department, São Paulo, SP, Brasil, **4** Hospital Israelita Albert Einstein, Blood Bank Department, São Paulo, SP, Brasil, **5** Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

Abstract

Since 2004, when a case report describing the use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) infusion as a therapy for GVHD after bone marrow transplantation, a new perspective in MSC function emerged. Since then hMSCs immunomodulatory potential became the target of several studies. Although great progress has been made in our understanding of hMSCs, their effect on T cell remains obscure. Our study has confirmed the already described effect of hMSCs on lymphocytes proliferation and survival. We also show that the impairment of lymphocyte proliferation and apoptosis is contact-independent and occurs in a prostaglandin-independent manner. A potential correlation between IL-7 and hMSCs effect is suggested, as we observed an increase in IL-7 receptors (CD127) on lymphocyte membrane in MSC presence. Additionally, blocking IL-7 in hMSCs-lymphocytes co-cultures increased lymphocytes apoptosis and we also have demonstrated that hMSCs are able to produce this interleukin. Moreover, we found that during Th1/Th17 differentiation *in vitro*, hMSCs presence leads to Th1/Th17 cells with reduced capacity of INF- γ and IL-17 secretion respectively, regardless of having several pro-inflammatory cytokines in culture. We did not confirm an increment of Treg in these cultures, but a reduced percentage of INF- γ /IL-17 secreting cells was observed, suggesting that the ratio between anti and pro-inflammatory cells changed. This changed ratio is very important to GVHD therapy and links hMSCs to an anti-inflammatory role. Taken together, our findings provide important preliminary results on the lymphocyte pathway modulated by MSCs and may contribute for developing novel treatments and therapeutic targets for GVHD and others autoimmune diseases.

Citation: Normanton M, Alvarenga H, Hamerschlak N, Ribeiro A, Kondo A, et al. (2014) Interleukin 7 Plays a Role in T Lymphocyte Apoptosis Inhibition Driven by Mesenchymal Stem Cell without Favoring Proliferation and Cytokines Secretion. PLoS ONE 9(9): e106673. doi:10.1371/journal.pone.0106673

Editor: Deniz Unutmaz, New York University, United States of America

Received: May 30, 2014; **Accepted:** July 30, 2014; **Published:** September 3, 2014

Copyright: © 2014 Normanton et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) funded this project through the grant number 2011/02027-4. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: lmarti@einstein.br

Introduction

The immunomodulatory activity of mesenchymal stem cells is at the basis of their therapeutic use in graft versus host disease (GVHD) which was first reported by Le Blanc et al. in 2004. After receiving human mesenchymal stem cells (hMSCs) infusions, the patient had significant clinical improvement without showing adverse reactions [1]. Since then, several studies have addressed the potential use of hMSCs to down regulate immune responses. Mesenchymal stem cells (MSCs), also known as mesenchymal stromal cells, are adult non-hematopoietic stem cells that were first described as plastic-adherent fibroblast-like cells capable of self-renewal and of differentiation into other cell type [2,3].

In 2006, the International Society for Cellular Therapy proposed a set of phenotypic and functional criteria to define MSCs [4], which isolation is possible from a variety of sources [5–7]. However, the bone marrow still is the most studied source of hMSCs, mainly because it is the one used in cell therapy clinical

trials. Although MSC immunomodulation occurs by distinct cell signaling pathways in humans and in animal models, an effector activity common to mouse, monkey and hMSCs is the inhibition of lymphocyte proliferation. Several causes of this inhibition have been described such as depletion of tryptophan by indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), up-regulation of prostaglandins secretion, oxidative stress or reactive oxygen species and nitrogen radicals (mainly in animal models) or, in humans, the action of INF- γ [8,9]. The proliferative responses of T cells, whether stimulated by alloantigen [10–12], antigenic peptides [13], mitogens [10,14] or by anti-CD3/CD28 antibodies, were suppressed in the presence of MSCs suggesting non-specificity of mechanisms.

However, as bone marrow derived MSCs reside in hematopoietic stem cell niches they primarily affect the differentiation and maintenance of hematopoietic stem cells. Most likely MSCs influence the survival of their neighbor cells, either by contact-dependent interactions or by secreting soluble molecules [15,16].

Recently it was shown that MSCs secrete multiple cytokines, promote angiogenesis and have distinct effects on chemotaxis and apoptosis [17].

Among the cytokines that affect T cell proliferation, interleukin-7 (IL-7), is a cytokine secreted by stromal cells that is critical for the development, homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. The absence of IL-7 or any of its proximal signaling components leads to a severe combined immunodeficiency (SCID). IL-7 is detected by a two-part receptor on lymphocytes, consisting by a γ -chain that is shared by multiple cytokines and a more specific receptor IL-7R α . IL-7R signals through the Jak/STAT and PI3K/Akt signaling pathways, both of which are known to have effects on cell survival, growth and metabolism. Although, the specific role and mechanism by which IL-7R may influence each of these processes *in vivo*, has not been fully determined [18–20].

Given that relatively little is known on the mechanisms that underlie the control of GVHD and T cell proliferation by MSCs in humans, we undertook the present investigation. To this end we studied the effect of hMSCs on phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes cultures. Phytohemagglutinin (PHA) is a mitogen that stimulates very robust activation and proliferation of T cells. We evaluated the cytokine secretion patterns by lymphocytes when in contact with MSCs in culture, their effect on activation-induced lymphocyte cell death (AICD) rates, and the participation of prostaglandins and IL-7 in the death-signaling pathway. Because Th1/Th17 and INF- γ /IL-17 participate in GVHD-inflammation [21] and given the beneficial effect of hMSCs infusion at reducing the intensity of GVHD, we also investigated whether MSCs would influence Th1 and Th17 differentiation or INF- γ and IL-17 secretion.

Briefly, we found that hMSCs suppression of lymphocyte proliferation and apoptosis did not depend on cell-contact and was not mediated by prostaglandins. In addition, depletion of IL-7 in co-cultures increased apoptosis suggesting that T cell survival is promoted by this cytokine. Furthermore, hMSCs reduced INF- γ and IL-17 synthesis and the frequency of Th1/Th17 cells in co-culture with no increment of Treg cells. Our findings pave the way to a better understanding on how hMSCs act on lymphocytes and may contribute for further applications of these powerful therapeutic cells.

Materials and Methods

Cells isolation

hMSCs were obtained from health bone marrow donors, by washing the cells trapped in the dischargeable collection filter as previously described by Deus et al [22]. The lymphocytes were obtained from health donor's peripheral blood following the signing of informed consent (Approved by Hospital Albert Einstein Ethical Committee -10/1412; CAAE: 06592712.4.0000.0071).

Peripheral blood cells were diluted 1:3 (vol/vol) with Phosphate Buffered Saline (PBS). Next, the suspension were transferred to a 50 mL conical tube containing 20 mL of Ficoll-Paque 1.077 density (GE Healthcare, United Kingdom) and centrifuged (30 min/500 g) at 22°C. Then, the cells from the interface were collected, resuspended and centrifuged again (5 min/500 g). The supernatant was discarded and cells resuspended with DMEM-LG, supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic and 2 mM L-glutamine, in order to achieve 1×10^6 cells/mL. In order to deplete monocytes the cells were placed in a petri dish previously coated with human albumin 20% (Sandoz, Germany), next the cells were incubated for 1 hour in humidified 5% CO₂ incubators at 37°C, the non-adherent cells were removed, and the

efficiency of depletion was verified by flow cytometry. The mentioned culture media, supplements and PBS were bought from Gibco (Carlsbad, CA).

Bone marrow collection filters were washed with 20 mL DMEM-LG; the cells were diluted 1:3 (vol/vol) with Phosphate Buffered Saline (PBS). Next, the suspension were transferred to a 50 mL conical tube containing 20 mL of Ficoll-Paque 1.077 density (GE Healthcare, United Kingdom) and centrifuged (30 min/500 g) at 22°C. Then, the cells from the interface were collected, resuspended and centrifuged again (5 min/500 g). The supernatant was discarded and cells resuspended with DMEM-LG, supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic, 2 mM L-glutamine, in order to achieve 1×10^5 cells/mL. The mentioned culture media, supplements and PBS were bought from Gibco (Carlsbad, CA). Next, cells (5 mL) were cultivated into 25 cm² flasks for 48 hours and maintained in humidified 5% CO₂ incubators at 37°C to favor the attachment of the hMSCs to the flask bottom. The non-adherent cells were removed, the adherent layer was washed twice with DMEM-LG, than maintained in culture until the 4th passage.

hMSCs were characterized by flow cytometry and checked for the ability to differentiate in osteocytes, chondrocytes or adipocytes as previously published by our group and briefly described below [22].

Mesenchymal stem cell characterization by flow cytometric expression markers

Cells from passage four were used to analysis of cell surface markers. The cells were washed with PBS, and then detached from the plastic with TryPLE (Gibco Carlsbad, CA). Next, the cells were stained for CD106-FITC (clone: 51-10C9), CD73-PE (clone: AD2), CD34-PE (clone: My10), CD105-PE-CF594 (clone: 266), CD90-PE-Cy7 (clone: SE10), CD29-APC (clone: MAR04), CD14-Alexa 700 (clone: M5E2) from BD Pharmingen (San Diego – CA), CD44-PerCP-Cy5 (clone: G44-26), HLA-DR-APC-H7 (clone: G46-6) from Biosciences (San Jose – CA), CD45-V500 (clone: H130) and CD31-V450 (clone: WM59) from Biogend (San Diego – CA), and for fluorescence minus one (FMO). After staining, the tubes were incubated at room temperature for 30 minutes, followed by a wash step; the cell pellet was resuspended and measurements were performed using FAC-SARIA equipment (BD Biosciences).

The human mesenchymal stem cells (hMSCs) used in our assays fulfilled this identity criteria established by the International Society for Cell Therapy (ISCT), as shown by Figure S1.

Mesenchymal stem cell characterization by adipocyte, chondrocyte and osteocyte differentiation

After the establishment of hMSCs cultures on the fourth passage, the cells were differentiated into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes.

Adipogenesis was induced by addition of an adipogenic medium to hMSCs culture, this medium was comprised by Alpha-MEM supplemented with 10% FBS, 1 μ M dexamethasone, 100 μ g/mL 3-Isobutyl-1-methylxanthine, 10 μ g/mL insulin and 100 μ M indomethacin. The adipogenic medium was changed every other day for 3 weeks. After 3 weeks in culture the cells were stained to evidence lipid droplets formation. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes, washed, dehydrated in 60% isopropanol for 2 to 5 minutes, and stained with 0.5% Oil Red O (O-0625) in 100% isopropanol previously diluted in water.

Osteogenesis was induced by addition of an osteogenic medium which was comprised by Alpha-MEM supplemented with 10%

FBS, 1 μ M dexamethasone, 2 μ g/mL ascorbic acid and 10 μ M β -glycerophosphate. The osteogenic medium was changed every other day for 3 weeks. After 3 weeks in culture the cells were stained with Alizarin Red to evidence the calcium deposition. Next, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes, washed with distilled water, stained with Alizarin Red (2 g in 100 mL of distilled water) pH 4.2 (A5533) for 5 to 10 minutes and thoroughly washed.

Chondrogenesis was induced by addition of a chondrogenic medium which was comprised by Alpha-MEM supplemented with 10% FBS, 1 μ M dexamethasone, 2 μ g/mL ascorbic acid, 6,25 μ g/mL insulin, and 10 ng/mL TGF- β . Chondrogenic medium was changed every other day for 3 weeks. After 3 weeks in culture the cells were stained with toluidine blue for evidence the proteoglycans enriched matrix. For toluidine blue, the cells were fixed with ethanol 70% for 1 minute, ethanol 90% for 1 minute and absolute ethanol for 1 minute, then toluidine blue was added (1 g toluidine blue, 1 g sodium borate/100 mL of water) (198161).

The mentioned culture media and FBS were bought from Gibco (Carlsbad, CA) and the other reagents were all from Sigma (St Louis, MO).

The human mesenchymal stem cells (hMSCs) used in our assays fulfilled this identity criteria established by the International Society for Cell Therapy (ISCT), as shown by Figure S2.

Cell culture

hMSCs at 4th passage were transferred to a 6-well plate and maintained in culture until reaching 80% confluence. The lymphocytes were suspended in Xvivo15 (Cambrex, Walkersville, MD), supplemented with 1% human pooled serum AB (Life Technologies, Carlsbad, CA) and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, Carlsbad, CA) then stimulated with 1 μ g of phytohemagglutinin (PHA)/ 1×10^6 lymphocytes. Approximately 1×10^6 lymphocytes were added to 1×10^5 hMSCs. The co-cultures were incubated for 24, 48 and/or 72 hours before assessing for lymphocyte apoptosis/proliferation. Lymphocytes were also co-cultivated with hMSCs and PHA separated by transwell 0.2 μ m -anopore membrane (Nunc Kærstrup, Denmark). Control cultures of lymphocytes without PHA stimulation were also included in all experiments.

Mixed leucocyte reaction (MLR)

Dendritic cells were derived from monocytes selected for CD14 by magnetic selection column (Myltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The CD14⁺ cell population was dispensed into six-well plates containing X-vivo 15 medium (Cambrex) supplemented with antibiotic-antimycotics (Gibco). To generate immature dendritic cells (DCs), the cells were cultured in the presence of 20 ng/mL recombinant IL-4 (rIL-4) and 50 ng/mL rGM-CSF (both from R&D Systems, Minneapolis, MN) for six days (indicated as D6 cells). Mature DCs were obtained after 24 h (D7) after stimulation of the immature DC culture with 10 ng/mL rTNF- α (R&D System) plus 0.01 mmol/L of PGE2 (Sigma) [23].

In order to set up the MLR, matured DCs were irradiated at 1,500 rads and co-cultured with allogeneic lymphocytes at the concentration of 1 DC:100 Lymphocytes (1×10^5 : 1×10^6 respectively) in presence or absence of 1×10^5 allogeneic hMSCs. The proliferation rates were determined after four days of co-culture. Lymphocyte proliferation was measured by KI-67 nuclear staining on CD3⁺ gated population. The lymphocytes were gated based on SSC vs FSC, followed by CD3 gating; the selected events were analyzed in a second plot for KI-67 expression. The proliferation

negative control was lymphocytes without allogeneic DCs stimulation.

Treatment of cultures with Indomethacin, interleukin 7 or anti-IL-7 antibody

Co-cultures of PHA-stimulated lymphocytes and hMSCs were treated with different concentrations of Indomethacin (5, 25, 50 and 100 ng/mL) in order to verify if the blocking of prostaglandin synthesis would interfere with the anti-proliferative effects of hMSCs. Co-cultures of PHA-stimulated lymphocytes and hMSCs were also treated with different concentrations of polyclonal neutralizing goat anti-human IL-7 antibody (10 and 20 μ l) (R&D Systems) or with rIL-7 (10 and 20 ng/mL, R&D systems), in order to verify a possible activity of this cytokine on the anti-apoptotic effect of hMSCs on lymphocytes.

Th1 and Th17 differentiation

Naïve T lymphocytes derived from healthy volunteers peripheral blood, (CD4, CD45RA), were separated by indirect cell targeting by using Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Milenyi biotec) according manufactures instruction. Naïve T cells (80% purity) were stimulated with CD3/CD28 microspheres (Life Technologies), and cultured for 5 days, treated with 10 ng/mL of IL-1 β , IL-6, IL-23 and 5 ng/mL of TGF β (R&D Systems) for Th1 and with monoclonal antibodies (mAb) anti-IFN- γ (Clone: 25723.11) and anti-IL-2 (Clone: 5344.111) at 1:50 dilution bought from BD Biosciences for Th17. This protocol of naïve T cells to Th1/Th17 differentiation was carried out in presence or absence of hMSCs.

T-cell apoptosis and proliferation assay

Apoptosis and proliferation were measured by flow cytometric assays. Lymphocytes were stained according to manufactures instructions, using two different combinations: First combination was Annexin V-FITC, propidium iodide-PI and CD3-APC (clone: HIT3a) from BD Pharmingen, (CA, San Diego). The second combination used was KI-67-FITC (clone: MOPC-21), Caspase-3 activated-PE (clone: C92-605), CD4-APC (clone: RPA-T4) from BD Pharmingen and CD3-Per CP Cy5.5 (clone: SK7) from BD Biosciences. The corresponding isotype controls were used as control for both staining protocols.

Briefly, for testing apoptosis the lymphocytes were resuspended with Annexin-V binding buffer (BD Biosciences) and stained for Annexin V, PI and CD3 for 15 minutes; the samples were acquired for flow cytometric analysis within 30 minutes after finishing incubation. For proliferation and apoptosis, staining for surface markers as CD3 and CD4 was performed and the cells were incubated for 30 minutes following fixation using BD FACS Lysing solution (BD Biosciences). Next, the cells were permeabilized using BD FACS Permeabilization solution 2 (BD Biosciences) and the intracellular staining was performed. After washing, the cell suspension was submitted to FACS analysis.

T-cell BrdU proliferation assay

Lymphocytes were stimulated with 1 μ g of phytohemagglutinin (PHA)/ 1×10^5 lymphocytes. Approximately 1×10^5 lymphocytes were added to 1×10^5 hMSCs or cultured alone. These cultures were incubated for 48, and then pulsed with 10 μ M of BrdU (BD Pharmingen)/ 1×10^5 lymphocytes for another 24 hours. The lymphocytes were first stained for surface antigens such as CD3-PerCP Cy5.5, CD4-PE, then fixed and permeabilized. Next the cells were treated for 1 hour with DNase in order to expose the incorporated BrdU. Next, the staining with anti-BrdU-FITC was

performed following manufactures' instructions of FITC BrdU flow kit (BD Pharmingen).

Lymphocyte proliferation was measured by BrdU-FITC staining on CD3+ gated population. The proliferation negative controls were lymphocytes without PHA stimulation.

We also have used BD Trucount tubes (BD Biosciences) to determine the absolute number of proliferating T lymphocyte. The cells absolute number was calculated by using the following formula:

$$\frac{\text{number of events in the T cell gate}}{\text{number of events in absolute count bead region}} \times \frac{\text{number of beads per test}}{\text{test volume}} = \text{absolute count of cells}$$

Intracellular IL-7 detection on mesenchymal stem cells

To determine whether hMSCs produce IL-7 when in co-cultivation with lymphocytes, the cultures were maintained for 24 hours followed by BFA addition for 4 hours. hMSCs were stained with anti-CD105-PE (clone: 43A3; Biolegend – San Diego – CA). After 30 minutes of incubation the cells were washed, next fixed with lyses buffer (lyses buffer – BD Biosciences, San Diego, CA) followed by permeabilization (permeabilization solution 2–BD Biosciences). Next, we proceed the intracellular staining with polyclonal goat anti-human IL-7 antibody, followed by the secondary anti-goat FITC, the same were performed using isotype control.

Dendritic cells characterization

Dendritic cells were characterized by flow cytometry regarding their phenotype and maturation status according to the intensity of CD14, CD209, CD80, CD83 and CD86 expression as showed in Figure S3. The staining of the cells was performed using commercially available monoclonal antibodies (mAbs) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were stained for surface markers with the selected mAbs and incubated in the dark for 30 min at room temperature, followed by flow cytometry acquisition. The mAbs used to evaluate DC and its maturation were as follows: CD14-FITC (clone: M5E2), CD80-PE (clone: L307.4), CD83-PE (clone: HB15e), CD86-PE (clone: 2331), and CD209-PE (clone: DCN46) all purchased from BD Pharmingen, HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (clone: L243) from BD Biosciences and corresponding isotype control.

Th17 cell and regulatory T cell characterization

T cells in co-culture were characterized by flow cytometry assay and stained according to manufactures instruction. Briefly, for Th17 cells, the staining for surface markers CD4-APC (clone: RPA-T4), CD8-PE (clone: RPA-T8), CD45RA-FITC (clone: HI100), CD45RO-PE (clone: UCHL1), CD3-APC (clone: HIT3a) or CD3-Per CP-Cy5.5 (clone: SK7) from BD Pharmingen, CD4-APC-Cy7 (clone: SK3) and CD45 Per CP-Cy5.5 (clone: 2D1) from BD Biosciences, CCR5-FITC (clone: 45502) and CCR6-PE (clone: 53103) from R&D System, was performed and cells were incubated for 30 minutes following fixation using BD FACS Lysing solution (BD Biosciences). Next, cells were permeabilized using BD FACS Permeabilization solution II (BD Biosciences) and the intracellular staining was performed with Tbet-Per CP-Cy5.5 (clone: 4-46), anti-IL17A-FITC (clone: N49-653) from BD Pharmingen, RORγt-PE (clone: AFKJS-9) from eBiosciences,

IFN-γ-FITC (clone: 25723.11) from BD Biosciences and the corresponding isotype control.

For Treg cells, staining for surface markers CD45-PE-Cy7 (clone: HI-30), CD3-APC-Cy7 (clone: SK-7), CD4-FITC (clone: RPA-T4), CD25-APC (clone: M-A251) and CD127-PerCP-Cy5.5 (clone: HIL-7R-M21), was performed and cells were incubated for 30 minutes following fixation/permeabilization using Foxp3 staining Kit (BD Biosciences, San Jose, CA) and intracellular staining FoxP3-PE (clone: 259D/C7). FMO control was performed for CD25-APC and Foxp3-PE.

T-cell surface expression of CD127

CD127 was measured by flow cytometric assays. Lymphocytes were stained according to manufacture instructions for CD3-FITC (clone: HIT3a), CD127-PerCP-Cy5.5 (clone: HIL-7R-M21), CD4-APC (clone: RPA-T4) from BD Pharmingen and corresponding isotype controls. Briefly, the staining for surface markers CD3, CD4 and CD127 was performed and cells were incubated for 30 minutes followed by fixation using BD FACS Lysing solution BD Biosciences.

FACS analysis

Analysis of stained cells was performed using the BD FACSARIA equipment (BD Biosciences) and at least 10,000 events were acquired. The results were analyzed by FACSDIVA and/or FlowJo software (Treestar, Eugene, OR).

Statistical Analysis

GraphPad Prism Program was used to perform the statistical analyses. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test or ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons; *p* < 0.05 was considered significant.

Results

Mesenchymal stem cell reduces the proliferation of PHA and allogeneic DC stimulated T lymphocytes, and this suppression is not contact-dependent

CD3+ T cells PHA-stimulated and co-cultivated with hMSCs show 15% less cells expressing KI-67 compared with similarly stimulated cultures without hMSCs (Figure 1A), in absolute numbers, the cells expressing KI-67 decreased almost 50% from $(3.0 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5)$ up to $(1.7 \times 10^5 \pm 0.9 \times 10^5)$ (Figure 1B). Suppression of T cell proliferation by hMSCs (of the order of 50%) was also observed in allo DC-stimulated lymphocyte cultures (Figure 1C) compared to allogeneic cultures in the absence of hMSCs, showing that hMSCs play a role in T lymphocytes clonal expansion, either to a specific or nonspecific stimulus response. The flow cytometry approach and data that originated the figures are exemplified in Figure S4.

hMSCs were maintained separated from lymphocytes in transwell cultures or allowed direct contact with lymphocytes in culture wells. PHA-stimulated proliferation was significantly reduced in both culture settings showing that the suppressive effect on lymphocytes exerted by hMSCs did not require contact between these cell populations (Figure 1D).

To confirm that the cells have not only a low cycling percentage by lower expression of KI-67 but also a reduced number of division in hMSCs presence, we also performed a proliferation assay by other technique, measuring BrdU incorporation, and we found that a reduction on T cell division by hMSCs presence (of the order of 50%) was also observed in both percentage and absolute number of cells (Figures 1E–L).

Figure 1. hMSCs reduces proliferation of stimulated lymphocytes in a contact-independent manner. (A–B) A significant proliferation reduction of PHA stimulated lymphocytes (CD3) ($38.58 \pm 12.39\%$) assessed by expression of KI-67 was observed in presence of hMSCs (CD3:hMSC) ($24.39 \pm 12.39\%$), the same was observed when absolute number KI-67 expressing cells was evaluated decreasing from ($3.0 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$) up to ($1.7 \times 10^5 \pm 0.9 \times 10^5$) ($n=8$). (C) A significant proliferation reduction of DC stimulated lymphocytes (CD3:DC) ($12.95 \pm 2.23\%$) assessed by expression of KI-67 was also observed in presence of hMSCs (CD3:DC:hMSC) ($6.5 \pm 2.23\%$). ($n=8$). (D) There was significant reduction of lymphocytes proliferation assessed by expression of KI-67, when in presence of hMSCs (CD3:hMSC) ($16.18 \pm 4.99\%$) and with transwell (CD3:T:hMSC) ($12.67 \pm 0.83\%$) if compared to the control (CD3) (37.67 ± 6.63) ($n=6$). (E–G) Figures showing the cells after 72 hs of culture (E) Lymphocytes without stimulation (F) Lymphocytes PHA stimulated (G) Lymphocytes PHA stimulated in co-cultures with hMSCs (H–J) Figures showing the (%) of BrdU (H) Lymphocytes without stimulation (I) Lymphocytes PHA stimulated (J) Lymphocytes PHA stimulated in co-culture with hMSCs (K) A significant proliferation reduction of PHA stimulated lymphocytes (CD3) ($7.89 \pm 1.05\%$) assessed by BrdU incorporation was observed in presence of hMSCs (CD3:hMSC) ($3.37 \pm 1.12\%$), (L) the same was observed when absolute number of BrdU expressing cells were evaluated in absence ($0.6 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$) or presence of hMSCs ($0.2 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$) ($n=6$). Significant p-values showed in the graphic. doi:10.1371/journal.pone.0106673.g001

Addition of Indomethacin to the cultures decrease PHA-stimulated T cell proliferation but in contrast tryptophan addition restores lymphocytes proliferation

Because prostaglandins and specially PGE2 are known suppressor molecules of lymphocyte proliferation it was of interest to check whether they participated in the suppression exerted by hMSCs on lymphocyte proliferation. However, the addition of indomethacin that blocks the cyclooxygenase 1 and 2, failed to abrogate the hMSCs-mediated suppression in PHA-stimulated lymphocytes. On the contrary, indomethacin treatment decreased in a dose-dependent manner the proliferation of lymphocytes (Figure 2A). The depletion of tryptophan by the stimulated activity of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is a common cause of decreased lymphocyte proliferation, because this aminoacid is essential for cellular proliferation. As shown in Figure 2B, the addition of tryptophan completely restored PHA-stimulated proliferation in hMSCs-lymphocytes co-cultures to the levels observed in cultures of lymphocytes lacking hMSCs. Therefore, we suggest that tryptophan depletion determined by hMSCs is an important component of their suppressive effect on lymphocytes.

The rates of apoptosis/necrosis of PHA and allogeneic-DC-stimulated T lymphocytes are lower in co-culture with hMSCs and are partially contact-dependent

The reduced T lymphocyte proliferation rates observed in culture with hMSCs could reflect increased apoptosis of the former cells. However, co-cultures of hMSCs and CD3+ T cells stimulated with either PHA or allogeneic DC presented fewer apoptotic cells (Annexin V+) at 24 h of culture and also fewer apoptotic/necrotic cells (Annexin V+/Propidium Iodide+) at 48 h of culture in comparison with cultures that did not receive hMSCs (Figure 3A–D). The flow cytometry approach and data that originated the data in Figure 3 are exemplified in Figure S5. The results indicate that apoptosis or necrosis induction is not the cause of reduced proliferation by T cells when in co-culture with hMSCs. To evaluate whether the apoptosis-protective effect of hMSCs on co-cultured lymphocytes required contact between these two cell types, they were cultured separated by a transwell membrane or in conventional culture conditions that allow direct contact between the cells. The experiments showed that even separated by a membrane, hMSCs led to a reduction of lymphocytes apoptosis/necrosis, although the strongest protective effect occurred when cells were in contact (Figure 3E–F). The

experiment suggests that soluble factors secreted by hMSCs also contribute to the reduction of cell death rates of lymphocytes.

Interleukin 7 produced by hMSCs participates in the hMSCs-driven T Lymphocytes survival

As IL-7 has been described as cytokine that promotes cell survival, it is a candidate among the apoptosis-protective soluble factors produced by hMSCs in co-culture with T lymphocytes. Blocking IL-7 by adding anti-IL-7 antibody to hMSCs/lymphocytes co-cultures significantly enhanced early apoptosis (Figure 4A) while the addition of recombinant IL-7 to the cultures further decreased apoptosis (Figure 4B). These results suggest that IL-7 participates in the hMSCs-driven reduction of apoptosis observed in co-cultured lymphocytes. That hMSCs do indeed produce IL-7 was shown by the intracellular staining of IL-7 in 80% of hMSCs as detected by cytometry (Figure 4C–E). In addition we found that the presence of hMSCs in the cultures moderately enhanced (from $37 \pm 10\%$ to $44 \pm 10\%$) the frequency of T lymphocytes expressing the IL-7 receptor, CD127 (data not shown).

The presence of hMSCs in Th1 or Th17 lymphocyte differentiation cultures results in lower frequencies of cells and modifies the relative frequency of T regulatory and IFN- γ /IL-17-secreting cells

Since IFN- γ and IL-17 have been reported to be the main cytokines in the development and maintenance of GvHD, we also investigated whether the presence of hMSCs during *in vitro* differentiation of naïve T cells to Th1 or Th17 would affect the amount of cytokine production by these cells. As shown in Figure 5, the frequencies of IL-17- or IFN- γ expressing T cells that were differentiated by Th1-promoting protocols in the presence of hMSCs were about 50% lower than in the controls without hMSCs. The frequency of IL-17-expressing cells in cultures that underwent the Th17 differentiation protocol in the presence of hMSCs were also 40% lower than in control cultures not exposed to hMSCs. The FACS data are supplied in Figure S6.

Since it has been previously described that hMSCs favor Treg differentiation instead of Th17 [36] we looked at the frequencies of Treg during differentiation to Th17 in the presence of hMSCs, but we did not find significant differences in the number of Treg as compared to the cultures without hMSCs (Figure 6). However, because of the observed lower frequencies of IFN- γ /IL-17-secreting cells the ratio between Treg and IFN- γ /IL-17A-

Figure 2. Indomethacin reduces PHA stimulated lymphocytes proliferation in presence of hMSCs and tryptophan addition to these cultures recovery the lymphocytes proliferation. (A) Proliferation control (CD3) ($21.35 \pm 3.62\%$) is enhanced if compared to stimulated lymphocytes co-cultivated with hMSCs (CD3+hMSC) (16.75 ± 2.81). In addition, we observed that CD3+hMSC have their proliferation even more reduced when added of 50 ng ($11.99 \pm 2.92\%$), or 100 ng ($8.92 \pm 2.32\%$) of indomethacin. (B) Proliferation control (CD3) ($21.43 \pm 3.38\%$) is enhanced if compared with stimulated lymphocytes co-cultivated with hMSCs (CD3+hMSC) (7.55 ± 1.66). However, tryptophan addition to hMSCs condition (CD3+hMSC+TRY) recovered the proliferation (20.33 ± 5.03) ($n=4$). Significant p-values showed in the graphic. doi:10.1371/journal.pone.0106673.g002

Figure 3. hMSCs presence reduces apoptosis and/or necrosis of stimulated lymphocytes and it is partially-contact dependent. (A) Early apoptosis in PHA stimulated lymphocytes co-cultivated (CD3/hMSC) or not (CD3) with hMSCs. There is a significant reduction after 24 and 48 hs of cultivation in hMSCs presence (15.61 ± 3.55 ; $9.17 \pm 2.85\%$) as compared to hMSCs absence (20.28 ± 8.03 ; $12.71 \pm 2.0\%$) respectively. (B) Late apoptosis/necrosis in PHA lymphocytes stimulated in presence (CD3/hMSC) or not (CD3) of hMSCs. There is a significant reduction after 24 and 48 hs of cultivation in hMSCs presence (19.05 ± 10.83 ; $28.38 \pm 13.47\%$) as compared to hMSCs absence (24.00 ± 9.91 ; $41.95 \pm 11.73\%$) respectively. (C) Early apoptosis in DC stimulated lymphocytes co-cultivated (CD3:DC/hMSC) or not (CD3:DC) with hMSCs. There is a significant reduction after 24 and 48 hs of cultivation in hMSCs presence (9.80 ± 2.42 ; $12.09 \pm 1.87\%$) as compared to hMSCs absence (13.30 ± 1.82 ; $15.49 \pm 21.82\%$) respectively. (D) Late apoptosis/necrosis in DC stimulated lymphocytes co-cultivated (CD3:DC/hMSC) or not (CD3:DC) with hMSCs. There is a significant reduction after 24 and 48 hs of cultivation in hMSCs presence (7.79 ± 0.93 ; $11.46 \pm 2.64\%$) as compared to hMSCs absence (17.38 ± 1.83 ; $19.09 \pm 4.64\%$) respectively. (E) and (F) show early apoptosis and the late apoptosis, respectively of stimulated lymphocytes (CD3/PHA) and co-cultivated with hMSCs (CD3/hMSC) using a 0.2 μ m transwell (CD3T/hMSC) for 72 hours. (E) There is a significant reduction of early apoptosis in presence of hMSCs ($17.08 \pm 4.05\%$) if compared to control ($31.84 \pm 8.65\%$) and in presence of transwell ($25.85 \pm 7.39\%$). (F) A significant reduction of late apoptosis/necrosis of stimulated lymphocytes (36.41 ± 6.42) is observed if compared to values obtained in presence of hMSCs ($19.19 \pm 7.51\%$) and transwell ($25.73 \pm 9.34\%$). (n=8) Significant p-values showed in the graphic. doi:10.1371/journal.pone.0106673.g003

secreting cells increased which would favor a regulatory environment. The FACS data are supplied in Figure S7.

Discussion

In this study we were able to identify some of the many activities exerted by hMSCs to control or down-regulate the immune response. Our main findings are related with an anti-proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of hMSCs on lymphocytes. We have confirmed the anti-proliferative effect and

showed that hMSCs anti-apoptotic effect on lymphocytes, it is partially dependent of contact and related to IL-7. Another important finding it is that during Th1/Th17 differentiation *in vitro*, hMSCs presence have led to lymphocytes with reduced capacity of INF- γ and IL-17 secretion, regardless of having several pro-inflammatory cytokines in culture. Yet, due to these lower frequencies of INF- γ /IL-17-secreting cells, the ratio changed between Treg and INF- γ /IL-17A-secreting cells increased which favors a regulatory environment. This changed ratio is very

Figure 4. hMSCs produces Interleukin-7 which effect in PHA stimulated lymphocytes is likely hMSCs presence in early and late apoptosis. (A) Early apoptosis in PHA stimulated lymphocytes (CD3) is $34.7 \pm 7.05\%$ and in presence of hMSC is reduced (CD3:hMSC) ($24.6 \pm 5.11\%$) or stimulated lymphocytes plus interleukin-7 (CD3:IL-7) ($29.12 \pm 6.4\%$), but no difference is observed if compared with hMSCs co-cultivated cells plus IL-7 block agent (CD3:hMSC:IL-7BI) ($36.27 \pm 3.8\%$). (B) Late apoptosis/necrosis in PHA stimulated lymphocytes (CD3) is $38.55 \pm 1.76\%$ and in presence of hMSCs is reduced (CD3:hMSC) ($19.85 \pm 4.72\%$), in presence of IL-7 block agent (CD3:hMSC:IL-7BI) ($26.97 \pm 2.12\%$) or when stimulated lymphocytes plus interleukin-7 (CD3:IL-7) ($21.52 \pm 3.65\%$). (C) The first plot show the gate on hMSCs by SSC vs FSC (D) the hMSCs gated cells are analyzed for isotype controls (E) the hMSCs gated cells are analyzed for CD105 and IL-7, we observed that 80% of the cells expressed CD105 and co-expressed IL-7. (n=4) Significant p-values are showed in the graphic.
doi:10.1371/journal.pone.0106673.g004

important to GVHD therapy [21], and links hMSCs to an anti-inflammatory role (Figure 7).

Our data showing that PHA and allogeneic stimulated lymphocyte proliferation it is suppressed by hMSCs independently of contact, agreed with those from Di Nicola and Krampner [10,13]. In addition, Kim and Hemati have reported that hMSCs have the potential to alter macrophages phenotypes independently of contact with them [24].

Adding Indomethacin (IDT), a non-steroidal anti-inflammatory drug that inhibits cox-1 and 2 pathways, to the cultures revealed

that the anti-proliferative effect of hMSCs on lymphocytes have occurred in a prostaglandin independent manner. Nemeth et al, has reported a prostaglandin effect on lymphocytes anti-proliferative responses hMSCs-driven in human sepsis via macrophages reprogramming. Our diverging results might be explained by absence of monocytes/macrophages in our cultures [25]. The fact that our cultures were monocyte-depleted allows us to suggest that the anti-proliferative effect observed is prostaglandin-independent. A number of studies indicate that IDO has anti-proliferative effects [12,14,26,27,28]. However, while some of these studies suggest

Figure 5. Naïve T cells differentiated into Th1 and Th17 in presence of hMSCs secrete approximately 50% less INF- γ and IL-17. (A) Naïve T cells differentiated for Th1 in presence of hMSCs secrete less IL-17 ($3.17 \pm 0.86\%$) than the ones differentiated in their presence ($6.25 \pm 0.63\%$) (B) Naïve T cells differentiated for Th1 in presence of hMSCs secrete less INF- γ ($23.53 \pm 2.21\%$) than the ones differentiated in their presence ($40.97 \pm 7.41\%$) (C) Naïve T cells differentiated for Th17 in presence of hMSCs secrete less IL-17 ($15.97 \pm 0.95\%$) than the ones differentiated in their presence ($26.53 \pm 3.97\%$) (n=3). Significant p-values showed in the graphic.
doi:10.1371/journal.pone.0106673.g005

Figure 6. Presence of hMSCs do not switch the differentiation of naive T cells from IL-17A/IFN- γ secreting cells into regulatory T cells phenotype. (A) During Th1 differentiation, there is no significant differences between regulatory T cells numbers in presence of hMSCs (Treg+hMSC) ($2.38 \times 10^3 \pm 1.43 \times 10^3$) and in absence (Treg) ($2.02 \times 10^3 \pm 1.25 \times 10^3$). (B) During Th17 differentiation, there is no significant differences between regulatory T cells numbers in presence of hMSCs (Treg+hMSC) ($0.66 \times 10^3 \pm 0.22 \times 10^3$) and in absence (Treg) ($1.38 \times 10^3 \pm 0.78 \times 10^3$). doi:10.1371/journal.pone.0106673.g006

that these effects are prostaglandin-dependent [12], some authors believe that not prostaglandin but other molecules such as IL-10, IFN- γ , TGF- β or IL-6 would be associated to these effects [26–29].

IDO acts by depleting the environmental available tryptophan, which may lead cells to apoptosis, though, this was not what we observed, which agrees with other studies [29–31]. Therefore, the mechanism that inhibited apoptosis in our co-cultures seems to be

driven by IL-7. Cytokines such as IL-7, a member of the IL-2 family, has been reported as a possible molecule involved in apoptosis intrinsic and extrinsic pathways, by raising levels of anti-apoptotic proteins or inhibiting some pro-apoptotic proteins such as Bid, Bad or Bax [32]. IL-7 was described as a cytokine produced by several cells subsets such as T-cells, NK cells, monocytes and stromal cells [33,34].

Figure 7. Schematic representation of hMSC interaction with lymphocytes. (A) Soluble molecule, but not prostaglandin E2, that will maybe activate and enhance IDO pathway on hMSCs (B) As IDO activation consequence there is tryptophan depletion from the environment leading to down regulation in lymphocytes proliferation (C) hMSCs IL-7 secretion will lead lymphocytes to survive without interfering with proliferation (D) For unknown reasons hMSCs will lead to a down regulation in INF- γ and IL-17 secretion by T lymphocytes altering the environmental ratio between Th1:IFN- γ , Th17:IL-17 secreting cells and T regulatory cells. doi:10.1371/journal.pone.0106673.g007

In fact, we found that IL-7 blockage in lymphocytes:hMSCs co-culture enhances significantly early apoptosis while addition of IL-7 to control cells impairs early and late apoptosis. This inhibition effect was similar to what was observed in hMSCs presence. Supporting our findings, IL-7 has been described as maintaining the cell viability by repressing cell death factors and/or activating a life factor [33,35].

In addition, we observed that in co-culture the differentiation into Th1 and Th17 cells show a reduced capacity of INF- γ and IL-17 secretion, but there was not a significant increase in Treg differentiation in those co-cultures. Ghannam et al, also reported a reduced differentiation of Th17 in hMSCs presence, but to these authors, naïve cells were differentiating into a Treg phenotype instead to Th17 [36]. While we measured the amount of Treg cells considering the whole cell phenotype and FoxP3 protein expression, Ghannam et al measured FoxP3 by mRNA expression, which might explain why they obtained different results [36].

Taken together, our finds provide important preliminary results on the lymphocyte pathway modulated by hMSCs (Figure 7). Importantly we suggest that survival signals driven by IL-7 cytokine may play a prominent role on the apoptosis process. It remains unclear how IL-7 acts on CD3 T cells survival in our co-cultures and whether other molecules are involved with this process. Our findings pave the way to a better understanding on how hMSCs act on lymphocytes and may contribute for developing novel treatments and therapeutic targets for GvHD.

Supporting Information

Figure S1 Human mesenchymal stem cell (hMSC) phenotyping: Isotype control showed in red, markers staining showed in blue. Cells were first gated on SSC vs FSC, then analyzed for each marker. Less than 1% of hMSCs expressed CD106, CD34, CD45, CD31, CD14 and HLA-DR. At least 93% of the analyzed hMSCs, expressed CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105. (TIF)

Figure S2 hMSCs differentiation in 3 mesodermal lineages: (A) Staining with Alizarin red the osteoblast differentiation control (B) Staining with Alizarin red the osteoblast differentiation, evidencing the calcium deposits (C) Staining with Toluidine blue the chondroblast differentiation control (D) Staining with Toluidine blue the chondroblast differentiation, evidencing the presence of proteoglycans (E) Staining with Oil red the adipocytes differentiation control (F) Staining with Oil red the adipocytes differentiation, evidencing the presence of intracellular lipid drops. (60x). (TIF)

Figure S3 Dendritic cells differentiation and maturation: (A–E) CD14, CD209, CD80, CD83 and CD86 expression in M, iDC and mDC. (TIF)

References

1. Le Blanc K, Rasmussen L, Sundberg B, Göthelström C, Hassan M, et al. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*; 363(9419): 1439–41.
2. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakova SF, et al. (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*; 2 (2): 83–92.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284 (5411): 143–7.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 8(4): 315–7.
5. Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*; 276(5309): 71–4.
6. Beyer Nardi N and da Silva Meirelles L (2006) Mesenchymal stem cells isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*; (174): 249–82.
7. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. (2011) Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*; 20(1): 5–14.

Figure S4 PHA stimulated T lymphocytes proliferation. (A) Gate on forward and side scatter (B) Gate selection of CD3 positive cells. (C) T lymphocytes without stimulus, control for KI-67 staining. (D) PHA stimulated T lymphocytes proliferation (51.7%) in absence of hMSCs (E) PHA stimulated T lymphocytes proliferation (27.5%) in presence of hMSCs. (TIF)

Figure S5 PHA stimulated T lymphocytes apoptosis/necrosis. (A) Control – T Lymphocytes stimulated with PHA stained only with Annexin-V (B) Control – T Lymphocytes stimulated with PHA stained only with propidium iodide (PI) (C) T Lymphocytes stimulated with PHA in absence of hMSCs, show late apoptosis/necrosis (39.5%) represented by cells that are double positive for PI/AnnexinV and the early apoptosis cells (31.2%) represented by the single positive cell (Annexin-V). (D) Effect of hMSCs on lymphocytes apoptosis, result for late apoptosis/necrosis (15.9%) and the early apoptosis cells (14.3%). (TIF)

Figure S6 Graphic representation of gate strategy of lymphocytes cytokines production. (A–B) Naive lymphocyte differentiation into Th1 in absence of hMSCs, gate on IFN- γ intracellular (38%) and in hMSCs presence, gate on IFN- γ intracellular (21%) (C–D) Naive lymphocyte differentiation into Th1 in absence of hMSCs, gate on IL-17A intracellular (6%) and in hMSCs presence, gate on IL-17A intracellular production (3%) (E–F) Naive lymphocyte differentiation into Th17, gate strategy of double positive cells for ROR γ t and IL-17A in absence of hMSCs (31.1%) and (16.6%) in hMSCs presence. (TIF)

Figure S7 Graphic representation of gate strategy of regulatory T cells. In (A) Gate strategy of stimulated lymphocytes by scatter and CD45, (B) Gate on CD3 positive population (73%), (C) Gate strategy of double positive cells for CD3 and CD4 (55%), (D) Gate strategy in high CD25 (23.7%), (E) and low expression for CD127 (79.8%) and in (E) Gate strategy of double positive population for CD3 and FoxP3 expression (100%), (G–H) Fluorescence minus one (FMO) control for FoxP3 and CD25. (TIF)

Acknowledgments

We are thankful to FAPESP that have funded this project thought the grant number 2011/02027-4. We are also grateful to Prof. Ises de Almeida Abrahamson for reviewing this article and to Hospital Israelita Albert Einstein for all the support received.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LCM MN. Performed the experiments: LCM MN HA. Analyzed the data: LCM MN. Contributed reagents/materials/analysis tools: LCM AR NH LVR AK. Contributed to the writing of the manuscript: LCM MN. Suggestions: LVR.

8. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, et al. (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem cells*; 27(8): 1954–62.
9. Bernardo ME and Fibbe WE (2013) Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell*; 13(4): 392–402.
10. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, et al. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood*; 99(10): 3838–43.
11. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Däubener W, et al. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*; 103(12): 4619–21.
12. Aggarwal S and Pittenger MF (2003) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*; 102(4): 1815–22.
13. Kasperka M, Glennie S, Dymov J, Scott D, Taylor R, et al. (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*; 101(9): 3722–9.
14. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, et al. (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*; 109(1): 228–34.
15. Mendez-Ferrer S, Michaud TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, et al. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*; 466(7308): 829–34.
16. Rodríguez-Pardo VM and Vernet JP (2013) Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype CD34+kit+ in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Cellular & molecular biology letters*; 18(1): 11–33.
17. Boonema RA and Gernert DL (2012) Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS one*; 7(4): e35685.
18. Tian JT, Dadi E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, et al. (2001) IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 98(15): 8732–7.
19. Khaleel AR and Durum SK (2002) Lymphocyte: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nature reviews. Immunology*; 2(11): 817–30.
20. Jacobs SR, Michalek RD, Radenell JC (2010) IL-7 is essential for homeostatic control of T cell metabolism in vivo. *J Immunol*; 184(7): 3461–9.
21. Norman M and Martí LC (2013) Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein*; 11(2): 237–46.
22. Deus GC, Norman M, Hamerschlag N, Kondo AT, Ribeiro AA, et al. (2012) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable bone marrow collection filters. *Einstein*; 10(3): 296–301.
23. Martí LC, Pavan L, Severino P, Sibov T, Guillen D, et al. (2013) Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 109(1): 70–79.
24. Kim J and Hematti P (2009) Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental hematology*; 37(12): 1445–53.
25. Nemeth K, Lorkhavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, et al. (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*; 15(1): 42–9.
26. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Däubener W, et al. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*; 103: 4619–21.
27. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*; 149(2): 333–63.
28. Franco M, Romero-Moreno R, Li M, Galipeau J (2012) Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*; 20(1): 187–95.
29. Benvenuto F, Ferrar S, Gerdoni E, Gualandi F, Frasson F, et al. (2007) Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem cells*; 25(7): 1753–60.
30. Ramasamy R, Lam EW, Socero I, Tsato V, Bonnet D, et al. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*; 21(2): 304–10.
31. Khushfya MS, Vagabov AV, Temnov AA, Silaf AN (2014) Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy*; 16(5): 579–583.
32. Daniel NN and Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell*; 116(2): 205–19.
33. Hofmeister R, Khaleel AR, Benbernou N, Rajuvellyi E, Muegge K, et al. (1999) Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev*; 10(1): 41–60.
34. Al-Rawi MA, Mamed RB, Jiang WG (2003) Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 receptor (IL-7R) signalling complex in human solid tumours. *Histology and histopathology*; 18(5): 911–23.
35. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, et al. (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*; 12(5): 574–91.
36. Ghannam S, Pene J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H (2013) Correction: mesenchymal stem cells inhibit human th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of immunology*; 191(11): 5777.