

CARLA LONGO DE FREITAS

**PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS ESTROMAIS NO MODELO DE
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

CARLA LONGO DE FREITAS

**PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS ESTROMAIS NO MODELO DE
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron.

Versão Original.

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Freitas, Carla Longo
PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ESTROMAIS NO MODELO DE ENCEFALOMIELETTE
EXPERIMENTAL AUTOIMUNE / Carla Longo de Freitas;
orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -- São
Paulo, 2019.
93 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células tronco. 2. Autoimunidade. 3.
Imunomodulação. 4. Encefalomielite Experimental
Autoimune. I. Schatzmann Peron, Jean Pierre ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Carla Longo de Freitas

Titulo da Dissertação/Tese: Propriedades Imunomoduladoras de Células Tronco Mesenquimais Estromais no Modelo de Encefalomielite Experimental Autoimune.

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

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

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura: _____.
Nome: _____.
Instituição: _____.

Examinador (a): Assinatura: _____.
Nome: _____.
Instituição: _____.

Examinador (a): Assinatura: _____.
Nome: _____.
Instituição: _____.

Presidente: Assinatura: _____.
Nome: _____.
Instituição: _____.



CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada *Estudo do Perfil de miRNAs de Células Mesenquimais Estromais e de sua Função Imunomoduladora no Modelo de Encefalomielite Experimental Auto-imune*, registrada sob nº 011, nas fls. 28, do livro 03, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 30 de abril de 2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da **Lei Federal nº 11.794**, o Dr. (Dra.) Jean Pierre Schatzmann Peron (Investigador Principal) e os membros da equipe Carla Longo de Freitas, Cristiano Rossato e Wesley Nogueira Brandão. Esta licença de uso de animais expira em 30 / 04 / 2019.

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

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal *Study of the miRNA profile in strommal mesenchymal cells and their immunomodulatory function in the autoimmune experimental encephalomyelitis model*, registered as Number 011, in pages 28 of book 03, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 04 / 30 / 2015.

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

This license expires in 04 / 30 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 30 de abril de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária- CEUA - ICB/USP



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

Decl. CEUA.015.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **011/2015/CEUA**, aprovado em 30/04/2015, e por solicitação do Prof. Dr. **Jean Pierre Schatzmann Peron**, do departamento de Imunologia, informo que o título do projeto da aluna **Carla Longo de Freitas** foi alterado para "**Propriedades Imonomoduladoras de Células Tronco Mesenquimais Estromais no Modelo de Encefalomielite Experimental Auto-imune**" em decorrência de alterações no projeto, nas quais, a parte referente aos miRNAs não pode ser realizada.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2019.

Luciane Valéria Sita

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

À Heloísa V. A. Caetano (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Jean Pierre Schatzmann Peron pela oportunidade de realizar meu doutorado e por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa. O aprendizado e amadurecimento durante esses anos são imensuráveis.

Aos meus colegas de laboratório Wesley, Nagela, Lilian, Carolina e Claudinha por toda a ajuda na realização desse trabalho.

À Maria Eni e a todos os funcionários do ICB IV por todas as gentilezas.

Ao Dr. Danilo Candido por todo suporte científico.

À minha família querida e amada pelo suporte, apoio em todos os sentidos e, principalmente, pelo incentivo. Vocês são a minha base, minha fortaleza e meu porto seguro. Que sorte a minha ter vocês nessa jornada.

Ao Robert pelo companheirismo incondicional, por estar sempre ao meu lado me apoiando e pela família linda que iremos formar.

Aos queridos Eduardo e Angélica, por compartilharem e estarem presente no dia mais feliz da minha vida.

Às minhas grandes amigas Yuri, Bianca, Drica, Glauco, Soneca pela nossa amizade verdadeira que perdura há tantos anos e que perdure muito mais. Bons tempos de Unifesp!

Last but not least, I would like to thank Edgard, Marcelo, Sydney, Donna, Gareth, Stefan, Daniel, Alexander, Mydia, Audrey and Fabiano. I'm very glad for the crazy team we are. Thank you for trust me as an educator and the partnership so far.

Gratidão!

“Nada é fixo, nada é permanente. A vida é isso, essa transitoriedade.”

Cohen

RESUMO

Freitas, C. L. Propriedades Imunomoduladoras de Células Tronco Mesenquimais Estromais no Modelo de Encefalomielite Experimental Autoimune. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

A esclerose múltipla é uma doença degenerativa autoimune mediada por linfócitos T auto-reativos a epítomos de mielina que se ativam inicialmente na periferia e infiltram o sistema nervoso central, levando à inflamação, e desmielinização. O modelo murino, Encefalomielite Experimental Autoimune, (EAE) tem sido usado para estudar os possíveis mecanismos envolvidos na esclerose múltipla. Células-tronco mesenquimais estromais são células multipotentes indiferenciadas que possuem propriedades imunomodulatórias. Tubas uterinas humanas denominadas *htMSCs* são uma fonte rica de células tronco mesenquimais estromais. Desta forma, como não há cura para a esclerose múltipla, nós propomos avaliar o efeito modulatório das *htMSCs* no modelo da EAE. Nossos resultados demonstram que o tratamento com *htMSCs* reduz a expressão das moléculas CD80, CD86 e MHC II no baço e linfonodo de células dendríticas dos animais tratados e aumenta a produção de IL-10. No pico da doença, os animais tratados apresentam *score* clínico reduzido. No sistema nervoso, observa-se diminuição de células infiltrantes e de microglia residente ativada. O tratamento com *htMSCs* reduziu a frequência e número absoluto das células Th1 (T CD4⁺IFN- γ ⁺) e Th17 (T CD4⁺IL-17⁺) infiltrantes no cérebro. As medulas espinhais analisadas no pico e 30 dias pós-imunização apresentam expressão reduzida dos genes pró-inflamatórios *Ifng*, *Tbx21*, *Il-17*, *RorC* e aumento na expressão de genes *Bdnf* e *Ido*. Coletivamente, nossos dados demonstram que as *htMSCs* exercem um papel imunomodulador no modelo da EAE. O efeito imunomodulador das *htMSCs* é promissor, podendo ser utilizado no futuro como estratégia de tratamento para doenças autoimunes ou neurodegenerativas.

Palavras chave: 1. Células tronco. 2. Autoimunidade. 3. Imunomodulação. 4. Encefalomielite Experimental Autoimune.

ABSTRACT

Freitas, C. L. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Stem Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. [PhD thesis (Immunology)]. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Multiple sclerosis is an autoimmune degenerative disease mediated by T-lymphocytes auto-reactive to myelin epitopes that initially activate in the periphery and infiltrate the central nervous system, leading to inflammation and demyelination. The murine model, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) has been used to study the possible mechanisms involved in multiple sclerosis. Stromal mesenchymal stem cells are undifferentiated multipotent cells that have immunomodulatory properties. Human uterine tubes called htMSCs are a rich source of stromal mesenchymal stem cells. Thus, since there is no cure for multiple sclerosis, we propose to evaluate the modulatory effect of htMSCs in the EAE model. Our results demonstrate that treatment with htMSCs reduces the expression of CD80, CD86 and MHC II molecules in dendritic cells from spleen and lymph node of treated animals, and increases IL-10 production. At the disease's peak, treated animals showed a reduced clinical score. In the nervous system, there is a decrease in infiltrating cells and activated resident microglia. Treatment with htMSCs reduced the frequency and absolute number of infiltrating Th1 (T CD4 + IFN- γ +) and Th17 (T CD4 + IL-17 +) cells in the brain. Spinal cord analyzed at peak and 30 days post-immunization showed reduced expression of pro-inflammatory *Ifng*, *Tbx21*, *Il-17*, *RorC* genes and increased expression of *Bdnf* and *Ido* genes. Collectively, our data demonstrate that htMSCs play an immunomodulatory role in the EAE model. The immunomodulatory effect of htMSCs is promising and may be used in the future as a treatment strategy for autoimmune or neurodegenerative diseases.

Keywords: 1. Stem cells. 2. Autoimmunity. 3. Immunomodulation. 4. Experimental autoimmune encephalomyelitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

Figura 1 - Esquema representativo da resposta imunológica na esclerose múltipla.....	20
Figura 2 - Esquema representativo do efeito das <i>MSCs</i> em células do sistema imune.....	26
Figura 3 - Estratégia de Gate utilizada para análise de população de linfócitos infiltrantes e ativação da microglia no cérebro de animais com EAE tratados ou não com <i>htMSCs</i>	36
Figura 4 - Estratégia de Gate utilizada para análise da ativação das populações de macrófagos e células dendríticas no baço e linfonodo de animais com EAE tratados ou não com <i>htMSCs</i>	37
Figura 5 - Estratégia de Gate utilizada para análise de expressão de linfócitos e de citocinas intracelulares no baço, linfonodo e cérebro de camundongos com EAE tratados ou não com <i>htMSCs</i>	39
Figura 6 - Isolamento, cultura e diferenciação de <i>htMSCs</i>	45
Figura 7 - Caracterização fenotípica das <i>htMSCs</i>	46
Figura 8 - O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz o <i>score</i> clínico da EAE <i>in vivo</i> , reduz a neuroinflamação e danos histopatológicos e modula a expressão gênica na medula espinhal.....	50
Figura 9 - O tratamento com duas doses de <i>htMSCs</i> é mais efetivo em reduzir o <i>score</i> clínico da EAE <i>in vivo</i>	51
Figura 10 - Perfil de células dendríticas e macrófagos no baço e linfonodos de animais com EAE 7 dias pós-imunização.....	53

Figura 11 - Expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC II é reduzida em macrófagos (F4/80 ⁺ CD11b ⁺) nos linfonodos de animais com EAE tratados com <i>htMSCs</i>	55
Figura 12 - Expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC II é reduzida em células dendríticas (CD11c ⁺ MHC II ⁺) nos linfonodos de animais com EAE tratados com <i>htMSCs</i>	56
Figura 13 - A população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ é reduzida nos linfonodos de animais tratados com <i>htMSCs</i> nos estágios iniciais da EAE.....	58
Figura 14 - Perfil de citocinas do baço e linfonodos de animais tratados com <i>htMSCs</i> 7 dias pós-imunização e após re-estimulação <i>in vitro</i> com MOG.....	59
Figura 15 - O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz a progressão da EAE <i>in vivo</i> , mas não modula o perfil de células dendríticas e macrófagos no baço de animais com EAE 16 dias pós-imunização.....	61
Figura 16 - Expressão das moléculas CD86, CD80 é reduzida em células dendríticas (CD11c ⁺ MHC II ⁺) durante o pico da doença nos baços de animais com EAE tratados com <i>htMSCs</i>	62
Figura 17 - A população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ não é modulada no baço de animais tratados com <i>htMSCs</i> no pico da EAE.....	64
Figura 18 - Perfil de citocinas do baço de animais tratados com <i>htMSCs</i> 16 dias pós-imunização e após re-estimulação <i>in vitro</i> com MOG.....	65
Figura 19 - O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz o infiltrado celular no SNC de animais com EAE.....	67
Figura 20 - O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz o infiltrado de células Th1 e Th17 no SNC de animais com EAE.....	69

Figura 21 - Perfil de citocinas de células mononucleares do cérebro de animais tratados com <i>htMSCs</i> 16 dias pós-imunização e após re-estimulação <i>in vitro</i> com MOG.....	70
Figura 22 - O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz a neuroinflamação e modula a expressão gênica na medula espinhal.....	73
Figura 23 - <i>htMSCs</i> diminuem a expressão de genes de receptores e citocinas quimiotáticas.....	74
Quadro 1 - Genes representados na placa <i>Mouse Innate & Adaptive Immune Responses</i> PCR Array.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados numéricos de <i>htMSCs</i> positivas para os marcadores citados na figura 7.....	47
Tabela 2 - Média do <i>score</i> clínico de animais com EAE tratados com apenas uma dose de <i>htMSCs</i> no dia 0.....	48
Tabela 3 - Média do <i>score</i> clínico de animais com EAE tratados com duas doses de <i>htMSCs</i> nos dias 0 e 10 pós-imunização.....	49
Tabela 4 - Média do <i>score</i> clínico de animais com EAE tratados com apenas uma dose de <i>htMSCs</i> no dia 10 pós imunização.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A Esclerose Múltipla	18
1.2 Células Tronco Mesenquimais Adultas (MSCs)	23
1.3 Efeitos modulatórios das MSCs na EAE	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais Experimentais.....	29
3.2 Obtenção de tubas uterinas, isolamento e cultura de <i>htMSCs</i>	29
3.3 Diferenciação das <i>htMSCs</i>	30
3.3.1 - <i>Diferenciação Adipogênica</i>	30
3.3.2 - <i>Diferenciação Condrogênica</i>	30
3.3.3 - <i>Diferenciação Osteogênica</i>	30
3.4 Indução de EAE nos camundongos C57BL/6	31
3.5 Tratamento dos animais com <i>htMSCs</i>	31
3.6 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	31
3.7 Quantificação por PCR em Tempo Real	32
3.8 Obtenção de células mononucleares do sistema nervoso central	33
3.9 Obtenção de células do baço e linfonodos.....	34
3.10 Análises por citometria de fluxo	34
3.10.1 <i>Análise fenotípica das htMSCs</i>	34
3.10.2 <i>Avaliação de moléculas de ativação em células dendríticas, macrófagos e microglia</i>	35
3.10.3 <i>Avaliação de células Th1 e Th17</i>	38
3.10.4 <i>Dosagem de citocinas</i>	40
3.11 Histologia	40
3.11.1 <i>Coloração por Hematoxilina e Eosina</i>	40
3.11.2 <i>Coloração por Luxol Fast Blue</i>	41
3.12 Síntese de cDNA para PCR Array	41
3.13 PCR Array.....	42
3.14 Análise dos dados obtidos por PCR Array	43

3.15 Análises estatísticas	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Isolamento, cultura e análise fenotípica das <i>htMSCs</i>	44
4.2 O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz o score da EAE <i>in vivo</i> a longo prazo	47
4.2.1 As <i>htMSCs</i> são capazes de reduzir a progressão da EAE.....	47
4.2.2 O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz a neuroinflamação e danos histopatológicos no cérebro e medula espinhal de animais com EAE.....	48
4.2.3 As <i>htMSCs</i> inibem a transcrição de genes pró-inflamatórios dos linfócitos patogênicos e induzem a transcrição de genes imunomodulatórios	48
4.2.4 O tratamento com duas doses de <i>htMSCs</i> é mais efetivo em reduzir a progressão da EAE.	49
4.3 Avaliação da Imunomodulação das <i>htMSCs</i> durante o estabelecimento da EAE na periferia.....	52
4.3.1 Perfil de macrófagos e células dendríticas no baço e linfonodo durante o estabelecimento da EAE na periferia.....	52
4.3.2 <i>htMSCs</i> modulam a apresentação de antígenos e ativação de macrófagos e células dendríticas no linfonodo de animais no início da EAE	54
4.3.3 <i>htMSCs</i> reduzem a população de linfócitos T CD4 ⁺ no linfonodo de animais no início da EAE.....	54
4.4 Avaliação da Imunomodulação das <i>htMSCs</i> durante o pico da EAE na periferia.....	60
4.4.1 Perfil de macrófagos e células dendríticas no baço durante o pico da EAE na periferia	60
4.4.2 <i>htMSCs</i> não conseguem modular a população de linfócitos T CD4 ⁺ no baço de animais durante o pico da EAE na periferia.	63
4.5 Imunomodulação das <i>htMSCs</i> no sistema nervoso central durante o pico da EAE	66
4.5.1 O tratamento com duas doses de <i>htMSCs</i> reduz a neuroinflamação impedindo células inflamatórias de se infiltrarem no cérebro e diminuindo a ativação das células da microglia	66
4.5.2 O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz a infiltração de linfócitos patogênicos Th1 e Th17 no SNC.....	66
4.5.3 O tratamento com <i>htMSCs</i> reduz a produção das citocinas IFN- γ e IL- 17 no cérebro	68
4.6 Avaliação da medula espinhal no pico da doença em animais com EAE tratados com <i>htMSCs</i>	71

4.6.1 As <i>htMSCs</i> inibem a transcrição dos genes pró-inflamatórios e induzem a transcrição de genes imunomodulatórios na medula espinhal durante o pico da doença	71
4.6.2 As <i>htMSCs</i> diminuem a expressão de receptores de quimiocinas e citocinas quimiotáticas na medula espinhal de camundongos EAE.....	71
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	81
□ As <i>htMSCs</i> suprimem o estabelecimento dos sintomas e a progressão da doença em animais com EAE;	81
□ <i>htMSCs</i> modulam a transcrição gênica na medula espinhal inibindo a transcrição de genes relacionados aos perfis Th1 e Th17 e aumentando a expressão de genes imunomoduladores;.....	81
7 REFERÊNCIAS	82
Anexos.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é a doença idiopática inflamatória desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) mais prevalente. Dados emitidos pela Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF, *Multiple Sclerosis International Federation*) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) relatam que, em 2008 estimava-se que cerca de 2,1 milhões de pessoas eram afetadas pela EM no mundo, sendo predominantemente jovens adultos na América do Norte e Europa, com prevalência de 140 e 108 casos a cada 100.000 habitantes, respectivamente (Hauser and Oksenberg 2006). Em 2013, esse número aumentou para 2,3 milhões de pessoas, na proporção de 2:1 mulheres para cada homem (MSFI, 2013).

No Brasil, calcula-se que a prevalência da doença seja de 15 a 18 casos para cada 100 mil habitantes, chegando a 27 na região sul do Brasil (Finkelsztejn, Lopes et al. 2014). Estudos feitos em diferentes regiões do país relatam que dentre a população brasileira, a maior prevalência reside na forma recorrente/remitente e em mulheres (MSIF, 2013). Além disso, observou-se uma menor relação entre indivíduos da raça negra, quando comparados aos indivíduos de raça branca e parda (Grzesiuk 2006).

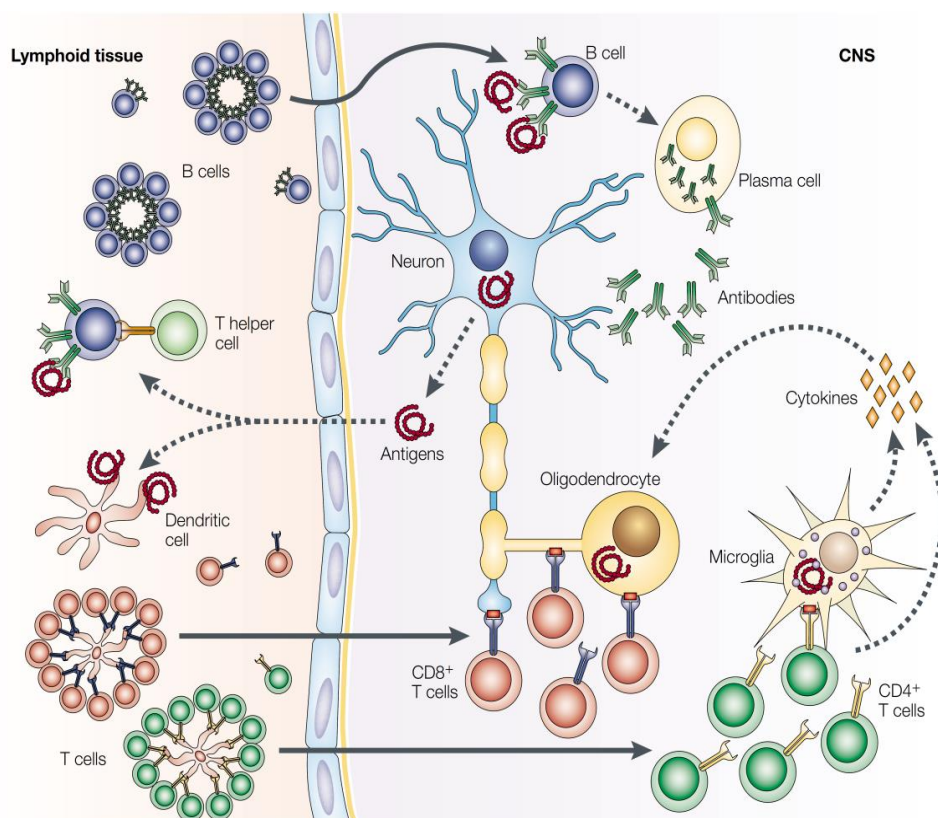
Essa doença é caracterizada pelo dano axonal mediado pelo sistema imune, produzindo lesões desmielinizantes no cérebro e medula espinhal que rompem a sinalização neuronal de forma significativa (Charcot 1881). Clinicamente, os sintomas neurológicos em pacientes com EM variam de leve a grave e tipicamente incluem um ou mais dos seguintes sintomas: sintomas sensoriais (40%), sintomas motores (39%), e outros sintomas como sensibilidade ao calor, fadiga (30%), alterações emocionais, alterações cognitivas (10%) (Bronner, Elran et al. 2010).

O curso da doença é altamente variável e imprevisível, sendo dividida em i) primária progressiva, ii) secundária progressiva, ou iii) remitente recorrente (Barkhof, Scheltens et al. 1992, Miller, Vanderlugt et al. 1997, Filippi, Rocca et al. 1998). No momento do diagnóstico, 85% das pessoas apresentam EM remitente recorrente. Estima-se que de 10 dessas pessoas, 8 irão desenvolver EM secundária progressiva. Cerca de 10% das pessoas são diagnosticadas com EM primária progressiva e 5% com EM progressiva recorrente (MSFI, 2013).

A EM é predominantemente mediada por linfócitos T auto-reativos à epítomos de mielina que são inicialmente ativados nos tecidos linfáticos periféricos e, subseqüentemente, infiltram o SNC (Pettinelli and McFarlin 1981). Macrófagos (MO), células dendríticas (DC), linfócitos T e B, e células da microglia já foram descritas como presentes nos locais de lesão (Ireland and Monson 2011, Chen, Chen et al. 2012, Olah, Amor et al. 2012). Após ativação e expansão clonal, tais células infiltram o SNC e, após serem ativadas *in situ* por células dendríticas residentes (Bailey, Schreiner et al. 2007) e células da microglia (Ponomarev, Shriver et al. 2005), estas passam a secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias que induzem ativação de astrócitos, células da microglia e células endoteliais, promovendo o processo inflamatório local e o estabelecimento das lesões (Figura 1).

Por outro lado, são os macrófagos e os linfócitos T CD8 citotóxicos (Goverman, Perchellet et al. 2005) que medeiam as lesões propriamente ditas, induzindo a morte de oligodendrócitos pela liberação de espécies reativas do oxigênio e de citocinas como o TNF- α , além de granzima e perforina. Já os linfócitos B são as células que mais chamam atenção durante a EM, pois atuam diretamente em várias etapas da resposta imune ao sistema nervoso. Dentre suas ações podemos citar a apresentação de antígenos, liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12) e ativação da via clássica do sistema complemento através de auto-anticorpos. Tais ações influenciam diretamente a resposta de macrófagos e linfócitos aumentando a resposta pró-inflamatória e promovendo um aumento nas lesões do SNC (Krumbholz, Derfuss et al. 2012).

Figura 1: Esquema representativo da resposta imunológica na esclerose múltipla.



Fonte: Hemmer B. et al., 2002 – *Nature Reviews Neuroscience*.

A EAE (do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) é um modelo desenvolvido em roedores há 50 anos (Kabat, Wolf et al. 1947) que compartilha diversas similaridades com os episódios inflamatórios agudos da EM, tanto clinicamente, quanto histopatologicamente. A EAE tem sido um modelo fundamental para elucidar os potenciais mecanismos que levam aos eventos que ocorrem na EM e seu uso tem promovido o desenvolvimento de estratégias de tratamentos.

A indução da EAE se dá através da inoculação subcutânea de antígenos de mielina como MOG₃₃₋₃₅ (do inglês, *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), MBP (do inglês, *Myelin Basic Protein*), e também PLP (do inglês, *Proteolipoprotein*) emulsificados em CFA (do inglês, *Complete Freund Adjuvant*). Tal procedimento leva a uma intensa ativação da resposta imune através da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, expansão de clones de linfócitos T CD4 e CD8 encefalitogênicos e o consequente

rompimento da barreira hematoencefálica e ativação das células residentes, tais como células da microglia e astrócitos (Friese, Montalban et al. 2006).

Na periferia, linfócitos T CD4⁺ diferenciam-se em Th1 e Th17, os quais têm sido envolvidos na patogênese da EAE (Dardalhon, Korn et al. 2008). De fato, as citocinas IFN- γ e IL-17 são conhecidas por serem importantes na neuroinflamação, uma vez que experimentos mostraram que camundongos IL-17 *knockouts* são altamente resistentes à indução de EAE (Komiyama, Nakae et al. 2006) enquanto camundongos deficientes em IFN- γ são mais suscetíveis, sugerindo que células Th17 podem ser mais relevantes do que as células Th1 nessa doença.

Em contrapartida, O'Connor *et al.*, utilizando o método da EAE passiva, mostrou que preparações com células IFN- γ ⁺ juntamente com células IL-17⁺ eram patogênicas; preparações apenas com células IFN- γ ⁺, eram também patogênicas; apenas com células IL-17⁺, não eram capazes de induzir a doença nos animais. Com isso, o grupo concluiu que apenas as células Th1 são capazes de infiltrar o SNC não inflamado e, após a lesão ser estabelecida primeiramente pelas células Th1, as células Th17 aparecem no SNC (O'Connor, Prendergast et al. 2008).

As células Th17 são reguladas pela expressão de fator de transcrição ROR γ T (Ivanov, McKenzie et al. 2006) e pela secreção de IL-17A, IL-17F e IL-23 (Kreymborg, Etzensperger et al. 2007) de uma maneira dependente de IL-6 + TGF β (Zhou, Ivanov et al. 2007). Estudos com humanos reportaram que pacientes com EM, durante a doença ativa, possuíam níveis de mRNA de IL-6 e IL-17 elevados no sangue e fluido espinhal, e que células parenquimais do cérebro, como células da microglia, células endoteliais e astrócitos, expressam constitutivamente o receptor IL-17R (Das Sarma, Ciric et al. 2009).

Em um trabalho realizado com camundongos deficientes em Act1 e mastócitos, molécula adaptadora da sinalização de IL-17, demonstrou-se que a sinalização nessas células leva à secreção de outras moléculas inflamatórias como CXCL2, CXCL9, CXCL12, IL-6 e MMP-9 (Kang, Altuntas et al. 2010).

Todas essas moléculas contribuem para o recrutamento de mais células inflamatórias e, assim, o perpetuamento das lesões.

Ainda, através do sistema Th17 *reporter* utilizando-se do camundongo *Il17^{Cre} YFP⁺*, foi descrito que o destino de células Th17 difere em um ambiente de inflamação aguda de um ambiente de inflamação crônica *in vivo*. Durante o desenvolvimento da EAE, na medula espinhal, dirigido pela citocina IL-23, ocorre o *switch* das células Th17 para células chamadas “*ex-Th17*”, as quais produzem IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias (Hirota, Duarte et al. 2011). Desse modo parece lógico que qualquer abordagem que consiga suprimir a geração e expansão de células Th17 poderia resultar na redução da severidade da doença.

Em relação à discussão acerca de qual população de linfócitos tem o papel crucial durante o processo inflamatório no SNC no modelo da EAE, foi descrito que essas populações infiltram o SNC por vias distintas. Enquanto os linfócitos Th1 infiltram o SNC por um mecanismo mediado pela integrina $\alpha 4$, particularmente VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$); os linfócitos Th17 utilizam $\beta 2$ integrinas LFA-1 ($\alpha L\beta 2$), atingindo o tecido alvo de maneira $\alpha 4$ independente (Rothhammer, Heink et al. 2011).

Por fim, Prajeeth et al. comparou a resposta de micróglia e astrócitos entre animais selvagens e deficientes em integrina $\alpha 4$ nos linfócitos T CD4, nos quais o tráfego de células Th1 para o cérebro é afetado durante a EAE. Os camundongos deficientes em $\alpha 4$ apresentaram pouca ativação da microglia, porém, a ativação de astrócitos foi semelhante à de camundongos do tipo selvagem nas regiões do cérebro povoadas com infiltrados Th17, sugerindo que as células Th17 têm como alvo astrócitos e não microglia (Prajeeth, Dittrich-Breiholz et al. 2018). Esse e outros dados descritos acima sugerem que ambas as populações de linfócitos têm papel na patogenicidade da EAE, porém, podem atuar em momentos ou locais diferentes.

O tratamento atual é focado em terapias anti-inflamatórias e imunomodulatórias, as quais têm sido um tanto bem sucedidas no tratamento

de episódios agudos de EM. Dentre as drogas mais utilizadas podemos citar o IFN- β : Betainterferona 1a (Avonex[®]), Betainterferona 1b (Betaferon[®]); e também Acetato de Glatirâmer (Copaxone[®]); além de Cloridrato de fingolimode (Gilenya[™]), Alentuzumabe (Lemtrada[®]), Fumarato de dimetila (Tecfidera[™]) e Teriflunomida (Aubagio[®]) (Jacobs, Cookfair et al. 1996, Jacobs, Beck et al. 2000, Gold, Kappos et al. 2012, Sanchez-de la Rosa, Sabater et al. 2012, Freedman 2013, Ruck, Afzali et al. 2016, Link, Ramanujam et al. 2017, Pilote, Simard et al. 2017). Anticorpos monoclonais como o Natalizumab (Tysabri[®]), anti-integrina $\alpha 4$; Rituximab (Rituxan[®]) e Ocrelizumab (Ocrevus[®]), anti-CD20, também são eventualmente utilizados (Moreno Torres and Garcia-Merino 2017), porém, foram relatados recentemente casos graves de efeitos adversos (Havla, Gerdes et al. 2011).

Infelizmente, não foi desenvolvido nenhum tratamento que iniba a progressão da doença em longo prazo ou sua cura por completo, uma vez que é necessária uma melhor compreensão da etiologia e da fisiopatogênese dessa doença. Nesse contexto, a busca por terapias alternativas, com menos reações adversas, é algo mandatário no caso de doenças crônicas.

1.2 Células Tronco Mesenquimais Adultas (MSCs)

Células tronco estromais adultas (do inglês, *Mesenchymal Stromal Cells*) são tipicamente definidas como células multipotentes não diferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e o potencial de se diferenciar em linhagens celulares distintas (Dominici, Le Blanc et al. 2006). Tal população constitui um reservatório nos tecidos conjuntivos na maioria dos órgãos e estão envolvidas na manutenção e reparo durante a vida pós-natal de um indivíduo.

Apesar de serem funcionalmente heterogêneas, as populações de MSCs humanas (*hMSCs*) isoladas de diferentes tecidos como medula óssea, músculo esquelético, tecido adiposo, polpa dentária, placenta e cordão umbilical apresentam um perfil similar de expressão de receptores de superfície (Bobis, Jarocho et al. 2006, Phinney and Prockop 2007, de Mendonca Costa, Bueno et al. 2008, Evangelista, Soncini et al. 2008, Secco, Zucconi et al. 2008,

Valtieri and Sorrentino 2008, Warburton, Perin et al. 2008). Entretanto, sabe-se que células-tronco adultas são definidas mais por suas propriedades funcionais do que por marcadores fenotípicos (Zhang, Liu et al. 2009).

As tubas uterinas humanas (do inglês, *Human Fallopian Tubes*) têm a mesma origem embrionária do útero. Estas sofrem mudanças dinâmicas induzidas pelo sistema endócrino durante o ciclo menstrual, como o crescimento celular e regeneração a fim de prover o ambiente requerido para a manutenção da viabilidade dos gametas femininos e masculinos, fertilização, o desenvolvimento inicial do embrião e seu deslocamento para o útero (Lyons, Saridogan et al. 2006).

Tubas uterinas descartadas durante procedimentos de esterilização feminina ou histerectomia são fontes ricas de células mesenquimais (*htMSCs – Human Tubal Mesenchymal Stromal Cells*) (Jazedje, Perin et al. 2009), as quais são responsáveis, em parte, pelo processo de regeneração deste tecido. De fato, a capacidade regenerativa extraordinária do endométrio humano após a menstruação, no período pós-parto, após procedimentos cirúrgicos (curetagem uterina e ablação endometrial) e mulheres na menopausa submetidas à terapia de reposição hormonal, sugere que nichos de *htMSCs* encontrados nesses tecidos seriam responsáveis por esses processos regenerativos (Gargett 2007). Sendo assim, essas células apresentam um potencial interessante nos estudos tanto de medicina regenerativa como por seu potencial imunomodulador.

Nosso grupo demonstrou que o tratamento de camundongos com EAE com células-tronco mesenquimais derivadas de endométrio humano (*hedMSCs – Human Endometrial-derived Mesenchymal Stem Cells*) diminuiu a inflamação do SNC e a progressão da doença devido à diminuição do infiltrado de células T encefalitogênicas no SNC (Peron, Jazedje et al. 2012). Os mecanismos sugeridos são derivados da análise de parâmetros anti-inflamatórios importantes, como aumento na expressão de Foxp3, IL-10, IL-27 e também de indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima sabidamente supressora da proliferação de linfócitos T. Nesse contexto, assim como as *hedMSCs*, as

htMSCs são também grandes candidatas para o estudo de estratégias terapêutica no tratamento da EM e outras doenças autoimunes.

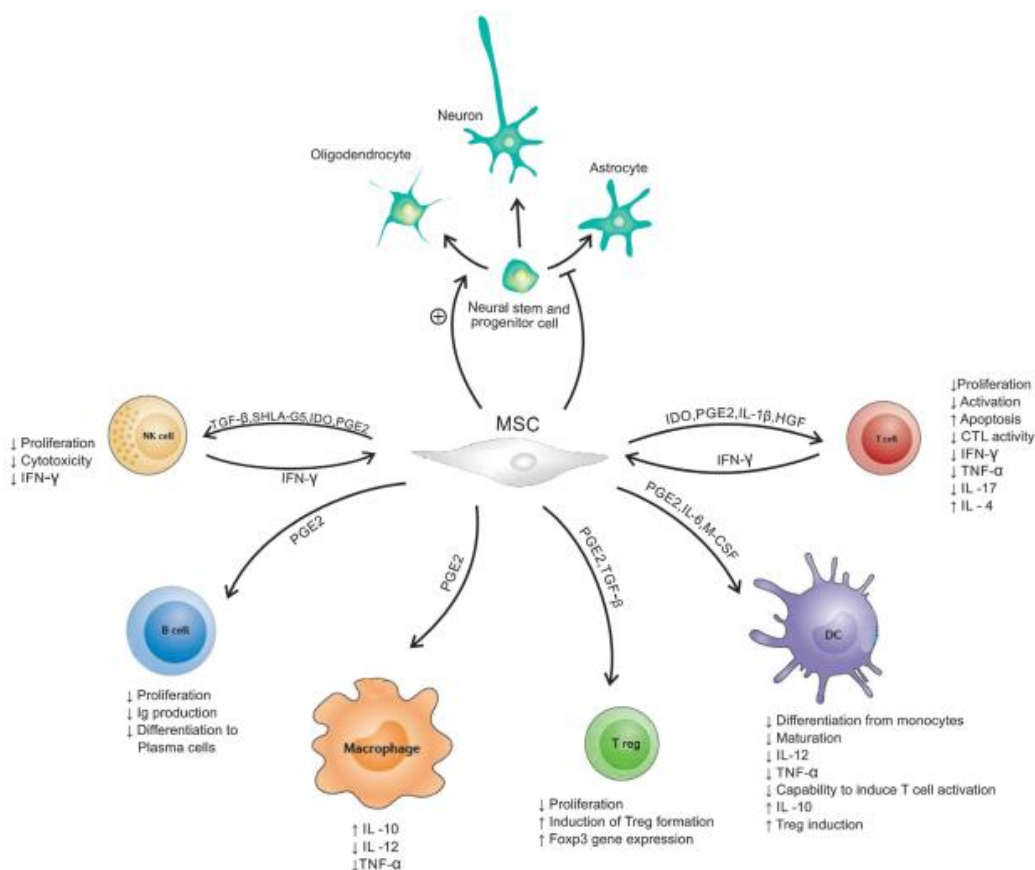
1.3 Efeitos modulatórios das *MSCs* na EAE

Estudos demonstraram que *MSCs* podem suprimir a ativação e função de várias células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas, linfócitos T e B (Uccelli, Moretta et al. 2008, Le Blanc and Mougiakakos 2012, Shi, Su et al. 2012, de Girolamo, Lucarelli et al. 2013). Nas DCs, por exemplo, as *MSCs* têm capacidade de inibir a diferenciação de monócitos CD14⁺ para DCs maduras (Jiang, Zhang et al. 2005), inibir a expressão de MHC II, CD80, CD86, e produção de IL-1 β , IL-12 e TNF (Zhang, Ge et al. 2004, Beyth, Borovsky et al. 2005).

As *MSCs* exibem propriedades imunomodulatórias e capacidade de migração direcional através do contato direto célula-célula e através da liberação de fatores imunossupressores solúveis (Uccelli, Moretta et al. 2008). Os principais fatores moduladores relacionados são: TGF- β , IFN- γ , NO,IDO, TSG6, PGE2, HO-1, antagonistas do receptor IL-1, IL-10 e uma variante da quimiocina CCL2 (Locatelli, Maccario et al. 2007, Ortiz, Dutreil et al. 2007, DelaRosa, Lombardo et al. 2009, Lee, Pulin et al. 2009, Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009, Rafei, Campeau et al. 2009, Spaggiari, Abdelrazik et al. 2009, Nemeth, Keane-Myers et al. 2010, Shi, Su et al. 2012).Tamanha quantidade de fatores supressores são aparentemente responsáveis não só por sua capacidade imunomoduladora (Figura 2), mas também pelo fato de serem tolerantes alogenicamente.

De certo, as propriedades imunomodulatórias das *MSCs* são benéficas, no entanto, a capacidade imunossupressora não é um fenômeno constitutivo, e sim, ocorre em advento de um *milieu* inflamatório, ou seja, as citocinas presentes no ambiente inflamatório ativam a função imunossupressora das *MSCs* (Ren, Zhang et al. 2008). Dessa forma, *MSCs* não suprimem reações imunológicas a

Figura 2 –Esquema representativo do efeito das MSCs em células do sistema imune



Fonte: Gharibi T. et al., 2015 – *Cellular Immunology*.

não ser que tenham sido previamente estimuladas por uma combinação de citocinas inflamatórias como, por exemplo, IFN- γ , TNF, IL-1 β ou IL-1 α (Krampera, Cosmi et al. 2006, Ortiz, Dutreil et al. 2007, DelaRosa, Lombardo et al. 2009, Lee, Pulin et al. 2009, Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009, Rafei, Campeau et al. 2009, Spaggiari, Abdelrazik et al. 2009, Nemeth, Keane-Myers et al. 2010, Shi, Su et al. 2012). Por fim, X. Han et al demonstrou que as citocinas IFN- γ e TNF- α agem sinergicamente no estímulo de MSCs e, o efeito imunossupressor é significativamente aumentado através da indução da expressão de iNOS nas MSCs, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, quando a citocina inflamatória IL-17 é adicionada (Han, Yang et al. 2014).

No modelo de EAE, *hMSCs* de diferentes fontes já foram utilizadas: derivadas de tecido adiposo, medula óssea, polpa de dentes, geléia de Wharton, cordão umbilical, placenta (Wang, Kimbrel et al. 2014, Liao, Pham et

al. 2016, Selim, Selim et al. 2016, Shalaby, Sabbah et al. 2016, Shimojima, Takeuchi et al. 2016, Anderson, Gonzalez-Rey et al. 2017, Giacoppo, Thangavelu et al. 2017, Torkaman, Ghollasi et al. 2017, Donders, Bogie et al. 2018). De um modo geral, as *hMSCs* foram capazes de reduzir a expansão de células Th17 pró-inflamatórias antígeno-específicas (Shalaby, Sabbah et al. 2016), induzir supressão da produção de IFN- γ e IL-17 (Donders, Vanheusden et al. 2015, Torkaman, Ghollasi et al. 2017), aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Hou, Ryu et al. 2013, Payne, Sun et al. 2013), diminuir o infiltrado inflamatório e atenuar a desmielinização (Liu, Zhang et al. 2013, Liao, Pham et al. 2016, Shimojima, Takeuchi et al. 2016)

Essas propriedades imunomodulatórias surpreendentes sugerem que *MSCs* tem um grande potencial para tratar distúrbios inflamatórios. Além do modelo da EAE, vale mencionar outros modelos nos quais as *hMSCs* humanas são utilizadas para o estudo de sua capacidade de modular células do sistema imune, como Lupus Eritematoso Sistêmico (Park, Kwok et al. 2015), Doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) (Kim, Moon et al. 2015, Luz-Crawford, Torres et al. 2016), Colite ulcerativa (Fuenzalida, Kurte et al. 2016) e Uveíte (Lee, Ko et al. 2015). Todos esses trabalhos mostram a redução das populações de linfócitos Th1 e Th17 frente ao tratamento com *hMSCs*.

Para a realização plena desse potencial, os mecanismos exatos pelos quais as *hMSCs* medeiam a imunomodulação durante vários processos ainda precisam ser determinados e estão sob investigação. Para tanto, no presente projeto, visamos avaliar *in vivo* o potencial imunomodulador das *htMSCs* no modelo de EAE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade imunomoduladora de células tronco estromais mesenquimais derivadas de tubas uterinas humanas (*htMSCs*) utilizadas como tratamento no modelo da encefalomielite experimental autoimune (EAE).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a progressão da EAE em animais tratados ou não com *htMSCs* com diferentes estratégias terapêuticas;
- Avaliar o fenótipo de macrófagos e células dendríticas no baço e linfonodos de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs*;
- Avaliar as populações de linfócitos Th1 e Th17 no baço, linfonodos e sistema nervoso central de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs*;
- Avaliar o padrão de citocinas secretadas por células do baço, linfonodos e sistema nervoso central de animais com EAE e tratados ou não com *htMSCs*;
- Avaliar células infiltrantes no SNC quanto às populações de linfócitos, macrófagos e ativação da micróglia;
- Avaliar o infiltrado inflamatório e desmielinização na medula espinhal de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs*;
- Avaliar a expressão dos genes *Bdnf*, *Ifng*, *Tbx21*, *IL-17A*, *Rorc*, *Bdnf*, *IL27* e *Ido* na medula espinhal de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

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

3.2 Obtenção de tubas uterinas, isolamento e cultura de *htMSCs*

As células *htMSCs* foram gentilmente cedidas por nossos colaboradores do Centro de Estudo do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e isoladas a partir de amostras de tuba uterinas obtidas em parceria com as clínicas Célula Mater e Centro Especializado em Reprodução Humana (CEERH). As amostras de tuba uterina humanas (*hFTs*) foram obtidas e cultivadas conforme descrito por Jazedje et al., 2009 (n= 3). Cada amostra foi coletada em meio *HEPES-buffered Dulbecco Modified Eagle Medium/Hams F-12 (DMEM/F-12; Invitrogen)* ou *DMEM high glucose (DMEM/High; Invitrogen)* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; *HyClone, Logan*), mantido a 4 °C, e processado em um período de 24 h. Todas *hFTs* foram lavadas duas vezes em tampão salino fosfato (PBS, *Gibco, Invitrogen*), cortadas com bisturi, colocadas em tubo falcon de 15 ou 50 mL e incubadas com 5mL de *TripLE Express (Invitrogen)* por 30 minutos, a 37 °C, em banho-maria. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado com uma pipeta *Pasteur*, lavado com 7 mL de DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB em um tubo falcon de 15 mL e centrifugado a 400 g por cinco minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 5 mL de DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 IU/mL, *Invitrogen*) e estreptomicina (100 IU/mL, *Invitrogen*) e mantidas em garrafas de cultura (25 cm²) em um ambiente de 5% de CO₂ e a 37 °C. O meio de cultura usado para

a expansão foi trocado a cada 72 h e duas vezes por semanas subseqüentemente.

3.3 Diferenciação das *htMSCs*

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

3.3.1 - Diferenciação Adipogênica

Células foram mantidas em cultura com o meio de diferenciação por duas semanas. Após a utilização do kit para diferenciação em adipócitos, as células foram obtidas ao dia 14 e avaliadas quanto à acumulação intracelular de vacúolos ricos em lipídios corados com *oil red O* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*). Para a coloração com *oil red O*, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 30 minutos, lavadas e coradas com a solução de *oil red O*, 16% por 20 minutos.

3.3.2 - Diferenciação Condrogênica

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

3.3.3 - Diferenciação Osteogênica

A diferenciação osteogênica foi mostrada pela formação de áreas positivas para hidroxapatita de cálcio no dia 21. Depois de duas lavagens com

PBS e uma lavagem com água destilada, as células foram incubadas com 1% nitrato de prata (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*) sobre a luz ultravioleta (UV) por 45 minutos. As células foram incubadas com 3% tiosulfato de sódio (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*) por 5 minutos. A coloração foi finalizada com o corante *Van Gieson*. A acumulação de cálcio é indicada pela cor preta.

3.4 Indução de EAE nos camundongos C57BL/6

Os animais C57BL/6 WT foram imunizados por via subcutânea com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ emulsificados em CFA (*Complete Freund Adjuvant*) (v/v) em 100 µg de *M. tuberculosis* H37. Adicionalmente foram dadas nos períodos 0 e 48 horas após imunização, 0,2 µg de toxina de *Bordetella pertussis* por via intraperitoneal. Os animais foram acompanhados diariamente e o grau de doença foi atribuído da seguinte forma: 0 – sem doença, 1 – perda do tônus da cauda, 2 – patas traseiras parcialmente paralisadas, 3 – paralisia total das patas traseiras, 4 – paralisia total das patas traseiras com paralisia parcial das patas dianteiras, 5 – paralisia completa ou morte.

3.5 Tratamento dos animais com *htMSCs*

As *htMSCs* foram removidas das garrafas de culturas por tripsinização, lavadas e contadas na câmara de Neubauer. Em seguida, foram injetadas conforme as estratégias de tratamento utilizadas: 1) uma dose de 1×10^6 células via intra-peritoneal no dia da imunização (dia 0), 2) duas doses de 1×10^6 células via intra-peritoneal aos dias 0 e 10 pós-imunização e 3) uma dose de 1×10^6 células via intra-peritoneal no dia 10 pós imunização. Os animais foram então acompanhados diariamente para avaliação do score clínico conforme descrito em 3.4.

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

A medula espinhal de animais com EAE tratados ou não com as *htMSCs* foi dissociada (*GentleMACS Dissociator, MyltenyiBiotec*) e o mRNA da medula espinhal foi extraído pela adição de 1 mL do reagente Trizol (*Invitrogen, EUA*)

durante 5 minutos a temperatura ambiente. A essa solução foram adicionados 500 μL de clorofórmio, o qual promoveu a separação de RNA, DNA e proteínas, após centrifugação a 12000 rcf por 15 minutos. A porção superior (transparente, que contém RNA) foi cuidadosamente retirada e transferida para outro tubo onde foi adicionado 500 μL de isopropanol. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, centrifugada a 12000 rcf por 10 minutos e sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Ao *pellet* obtido (nem sempre visível), foi adicionado 1 mL etanol 75% e centrifugado a 7600 rcf por 5 minutos a 4 °C e repetiu esse processo 3 vezes. Após a última lavagem, o etanol foi retirado e o tubo mantido invertido sobre a bancada até a secagem total do *pellet*. Finalmente, 25 μL de água ultrapura foram adicionados. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260/280 nm (*NanoDrop 2000, ThermoFisher*). Para a síntese de cDNA, foi realizada uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 2 μg de RNA diluídos em 5 μL foram adicionados a 5 μL de mix (2 μL *RT buffer*, 2 μL de *RT randomprimers*, 1 μL de *multiscribe* e 0,8 μL de dNTPs e 4,2 μL de água ultrapura). A mistura foi levada ao termociclador *Quant Studio, (Applied Biosystems)* e submetida a três ciclos (25 °C por 10'; 37 °C por 120'; e 85 °C por 5'). Decorridos os ciclos, foram adicionados 80 μL de água ultrapura.

3.7 Quantificação por PCR em Tempo Real

A partir do cDNA obtido, foi avaliada a expressão de mRNA de moléculas envolvidas na inflamação e de células Th1, Th17 e Tregs por PCR em tempo real (qPCR). A cada reação de PCR foi adicionado 0,5 μL de *20x TaqMan® gene expression assay*, 4,5 μL de *2x TaqMan® gene expression assay mastermix*, 5 μL de amostra de cDNA. As soluções foram levadas ao aparelho *Quant Studio3 (Applied Biosystems)* e submetidas a diferentes estágios (1, 50 °C por 2'; 2, 95 °C por 2'; 3, 95 °C por 15" e 60 °C por 1' x 40 repetições). As curvas foram normalizadas pela expressão da β -actina. A expressão gênica foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (amostra) – ΔCt (calibrador), e ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene

constitutivo. Abaixo segue a lista dos *primers TaqMan®*, que foram utilizados nos experimentos de PCR em tempo real:

Ifng	Mm01168134_m1
Tbx21	Mm00450960_m1
Il17a	Mn00439618_m1
Rorc	Mm01261022_m1
Foxp3	Mm00475162_m1
Bdnf	Mm00446190_m1
Il27	Mm00461162_m1
Ido	Mm01218005_g1
Actb	Mm0073933_m1

3.8 Obtenção de células mononucleares do sistema nervoso central

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

3.9 Obtenção de células do baço e linfonodos

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. O baço foi extraído no 7º dia pós-imunização e no pico da doença e os linfonodos inguinais, subaxilares e periaórticos foram extraídos apenas no 7º dia pós-imunização. Ambos foram processados em *cellstrainer* e centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* dos linfonodos foi ressuscitado em meio RPMI com 10% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e plaqueado para CBA (1 x 10⁶ células/poço), citometria de fluxo com marcação intracelular (2 x 10⁶ células/poço) e marcação de superfície (1 x 10⁶ células/poço). Ao *pellet* dos esplenócitos totais foi adicionado 1mL de tampão de lise de hemácias por 2 minutos, no gelo, e em seguida adicionado 15 mL de meio RPMI e centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4°C. Por fim, o *pellet* foi ressuscitado em meio RPMI com 10% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e plaqueado para CBA (1 x 10⁶ células/poço), citometria de fluxo com marcação intracelular (2 x 10⁶ células/poço) e marcação de superfície (1 x 10⁶ células/poço).

3.10 Análises por citometria de fluxo

3.10.1 Análise fenotípica das htMSCs

As htMSCs foram removidas das placas por tripsinização, lavadas e bloqueadas durante 20 minutos com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 da eBioscience® (*Fcblock*) a 4 °C. Em seguida, foram lavadas e incubadas durante 20 minutos a 4 °C com anticorpos *anti-human* conjugados específicos para CD14 (*PercP-Cy5.5*), CD29 (*PE*), CD31 (*Pacific blue*), CD44 (*FITC*), CD45 (*PercP*), CD73 (*PE-Cy7*), CD90 (*PercP-Cy5.5*), HLA-DR (*PE*) e HLA-ABC (*FITC*). Em seguida, as células foram novamente lavadas, centrifugadas a 450 g a 4 °C por 5 minutos e ressuscitadas em 200 µL de *MACS buffer*. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo BD Canto II (*BD Biosciences*) e analisadas no software *FlowJo 10*.

3.10.2 Avaliação de moléculas de ativação em células dendríticas, macrófagos e microglia

As células dos baços e linfonodos extraídas no 7º dia pós-imunização, e as células mononucleadas do SNC extraídas no pico da doença foram plaqueadas 1.10^6 células/poço. Posteriormente, as células foram bloqueadas com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 da *eBioscience*® (*Fcblock*). Após o bloqueio, as células do baço e linfonodo foram incubadas com anti-mouse F4/80 (*BV421*), CD11b (*APC*), CD11c (*APC-Cy7*), MHC II (*PE*), CD80 (*PercP-Cy5.5*), CD86 (*FITC*) durante 30 minutos a 4°C.

As células mononucleares foram incubadas com anti-mouse CD45 (*PercP*), CD11b (*APC*), MHC II (*FITC*) CD80 (*PE*). Em seguida, as células foram lavadas, centrifugadas a 450 g a 4°C por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de paraformaldeído 1%. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo *BDLSR Fortessa X20* (*BD Biosciences*) e analisadas no software *FlowJo 10*. Como estratégia de *gate* para análise de moléculas de ativação na microglia (Fig. 3), iniciamos demarcando os *singlets* (Fig. 3A) e, em seguida, escolhendo as células mononucleadas para o SNC pelos parâmetros de tamanho por granulosidade (Fig. 3B). Dentro das células mononucleadas visualizamos: células negativas para CD11b e com alta expressão de CD45 (linfócitos CD45^{high}CD11b⁻); as células positivas para CD11b e com expressão baixa de CD45 (microglia ativada CD45^{low}CD11b⁺) e as células com alta expressão de CD45 (macrófagos infiltrantes CD45^{high}CD11b⁺) (Fig. 3C). Dentro da população CD45^{low}CD11b⁺, observamos a expressão das moléculas CD80 (Fig. 3D) e MHC II (Fig. 3E).

Como estratégia de *gate* para análise de moléculas de ativação de macrófagos e células dendríticas do baço e linfonodos (Fig. 4) iniciamos demarcando os *singlets* (Fig. 4A) e, em seguida, escolhendo a população das células apresentadoras de antígenos (APCs) pelos parâmetros de tamanho por granulosidade (Fig. 4B). Dentro da população de APCs visualizamos as células positivas para F4/80⁺CD11b⁺ (Fig. 4C) e MHC II⁺CD11c⁺ (Fig. 4D). Dentro

dessas populações, observamos a expressão das moléculas CD80, MHC II e CD86 (Fig. 4E, F e G).

Figura 3 – Estratégia de Gate utilizada para análise das populações de linfócitos infiltrantes e ativação da microglia no cérebro de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs*. (A) Representa o *gate* em *singlets*; (B) Representa o *gate* na população de células mononucleares; (C) Representa o *gate* na população de linfócitos ($CD45^{high}CD11b^{-}$), na população de macrófagos ($CD45^{high}CD11b^{+}$) e na população de microglia ($CD45^{low}CD11b^{+}$); (D) Representa o *gate* da expressão da molécula CD80 na população de microglia $CD45^{low}CD11b^{+}CD80^{+}$; (E) Representa o *gate* da expressão da molécula de MHC II na população de microglia $CD45^{low}CD11b^{+}MHC II^{+}$.

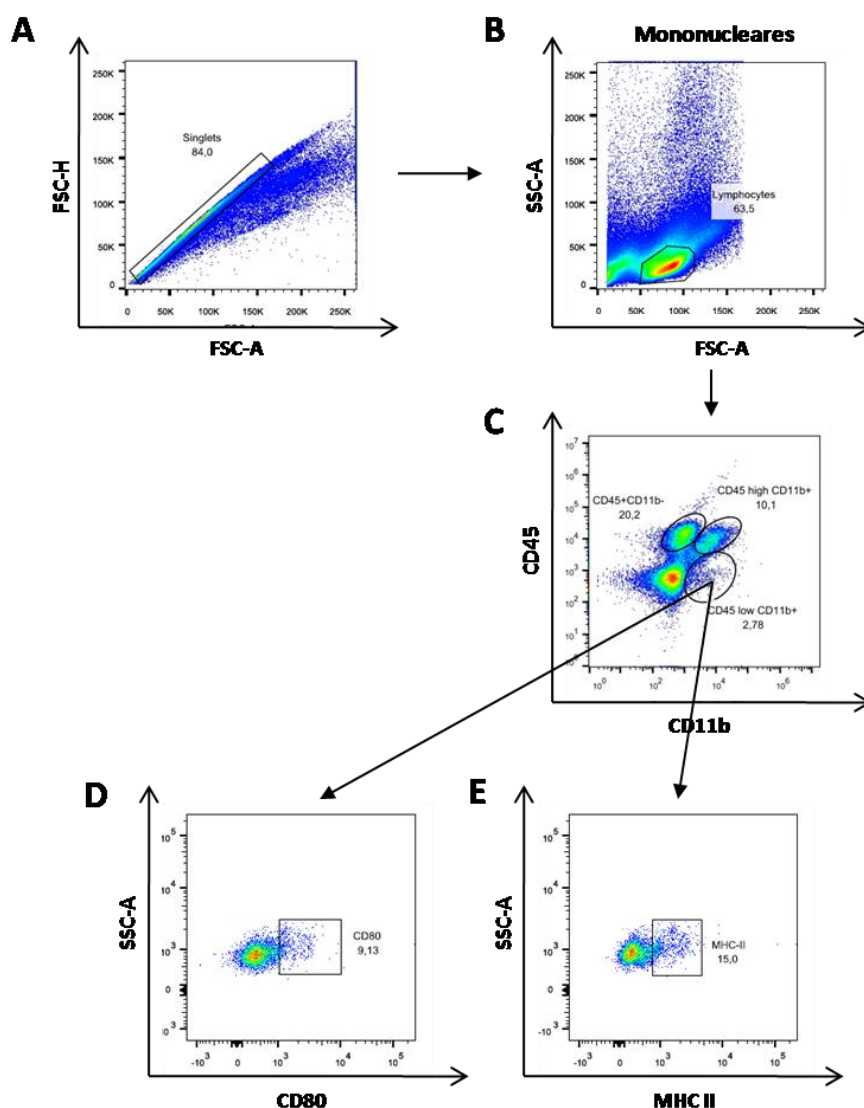
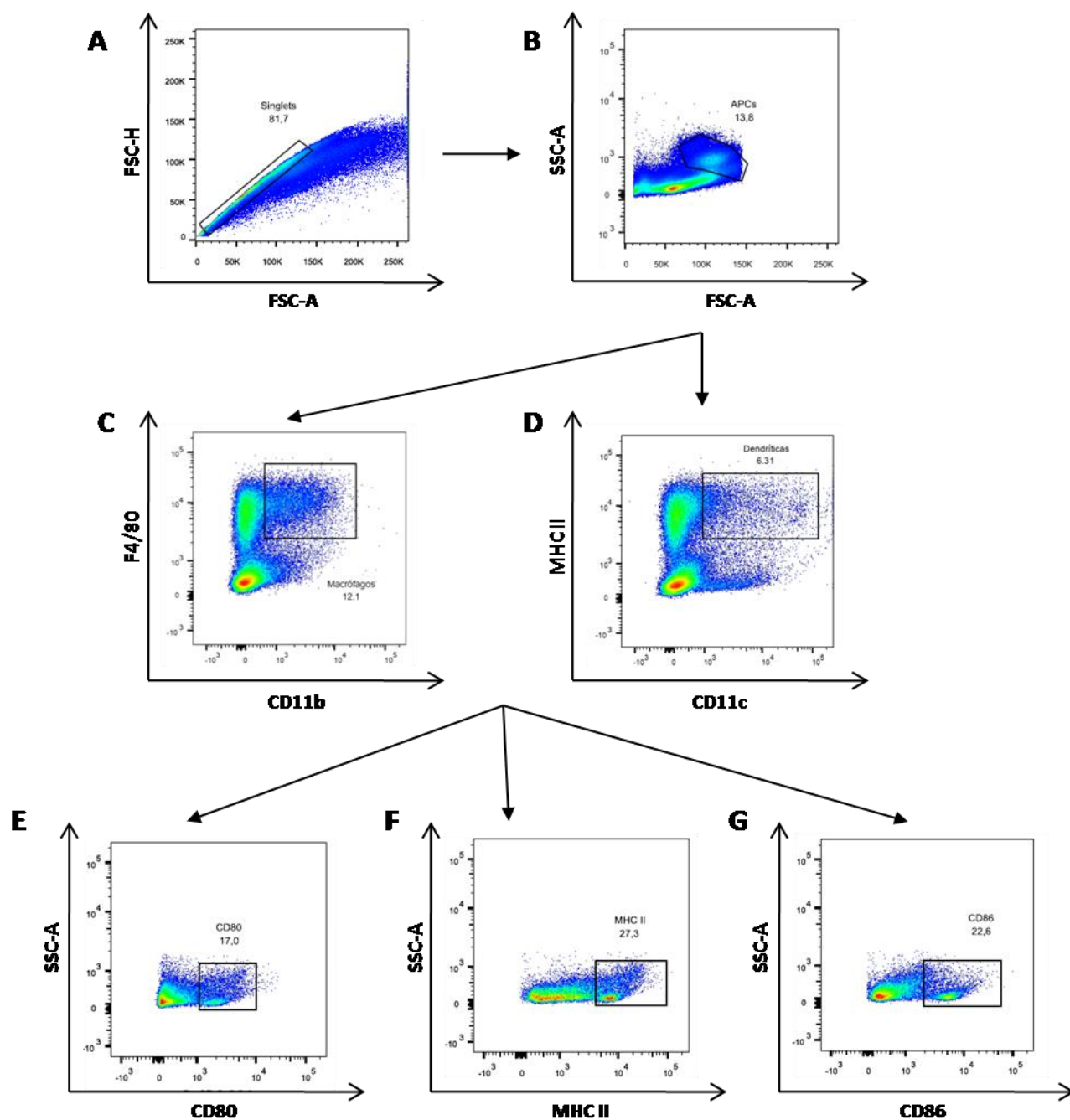


Figura 4 – Estratégia de Gate utilizada para análise da ativação das populações de macrófagos e células dendríticas no baço e linfonodo de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs*. (A) Representa o *gate* em *singlets*; (B) Representa o *gate* na população de APCs; (C) Representa o *gate* na população de macrófagos F4/80⁺ CD11b⁺; (D) Representa o *gate* na população de células dendríticas CD11c⁺ MHC II⁺; (E) Representa o *gate* da expressão da molécula CD80, (F) MHC II e (G) CD86 nas populações de macrófagos e células dendríticas.

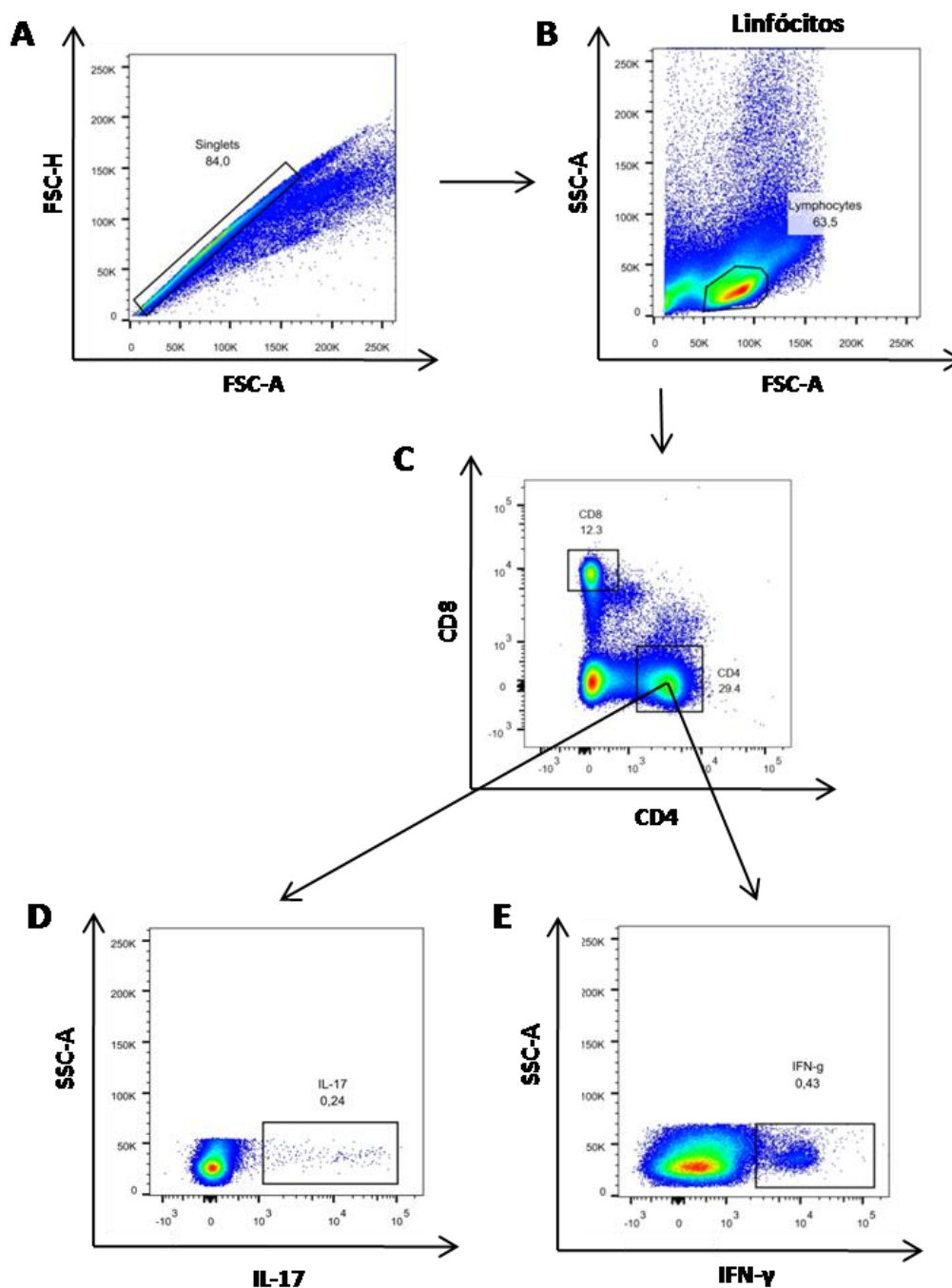


3.10.3 Avaliação de células Th1 e Th17

As células dos linfonodos extraídas no 7^o dia pós-imunização, os esplenócitos totais extraídos no 7^o dia pós-imunização e no pico da doença e as células mononucleadas do SNC extraídas no pico da doença foram plaqueadas 1.10^6 células/poço e estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg) *overnight*. Após esse período, as células foram estimuladas ou não PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1µg/mL) e todas as células foram acrescidas de brefeldina A (1µg/mL). Posteriormente, as células foram bloqueadas com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 da *eBioscience*® (*Fcblock*), lavadas e incubadas com anti-mouse CD4 (*FITC*) e CD8 (*PercP*) durante 30 minutos a 4°C. Para a avaliação das citocinas intracelulares, com o objetivo de caracterizar as populações de linfócitos T, as células foram ressuspensas em 100 µL de *Cytofix/Cytoperm kit* (*eBioscience*®) e incubadas por 20 minutos a 4°C. Em seguida, foram lavadas com 100 µL de *BD Perm/WashTM* e centrifugadas a 450 g a 4°C por 5 minutos. Após este processo, as células foram incubadas com o coquetel de anticorpos anti-mouse IFN- γ (*APC*), IL-17 (*PE*) por 20 minutos. Em seguida, as células foram novamente lavadas, centrifugadas a 450 g a 4 °C por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de *MACS buffer*. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo *BDLSRFortessa* (*BD Biosciences*) e analisadas no *software FlowJo 10*.

Como estratégia de gate na marcação intracelular para análise de linfócitos, iniciamos demarcando os *singlets* (Fig 5A) e, em seguida escolhendo as células mononucleadas para o SNC e linfócitos para baço e linfonodos pelos parâmetros de tamanho por granulosidade (Fig. 5B). Dentro das células mononucleadas ou dos linfócitos visualizamos as células positivas para CD8 e CD4 (Fig. 5C). Dentro de CD4, observamos a população CD4⁺IL-17A⁺ (Fig. 5D) e CD4⁺IFN-γ⁺ (Fig. 5E).

Figura 5 – Estratégia de Gate utilizada para análise de expressão de linfócitos e de citocinas intracelulares no baço, linfonodo e cérebro de camundongos com EAE tratados ou não com *htMSCs*. (A) Representa o gate em singlets; (B) Representa o gate em linfócitos/mononucleares; (C) Representa o gate na população de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺; (D) Representa o gate na população de linfócitos T CD4⁺ IL-17⁺; (E) Representa o gate na população de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺.



3.10.4 Dosagem de citocinas

Os esplenócitos totais, as células dos linfonodos obtidos no 7º dia e no pico da doença, e as células mononucleadas do SNC foram plaqueadas 1.10^6 células/poço e estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg); α-CD3 (1 µg/mL). Após 72 horas de cultivo o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 foi utilizado o *CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* da (BD Pharmingen®) conforme instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no aparelho de citometria de fluxo *FACS Accuri BD®* sendo adquiridos 2100 eventos de acordo com protocolo do fabricante.

3.11 Histologia

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

3.11.1 Coloração por Hematoxilina e Eosina

As lâminas histológicas foram desparafinizadas com imersão em xilol duas vezes durante 1 hora cada, seguido da hidratação do tecido, iniciando pela imersão em álcool etanol 100%, 95% e 70% por 10 minutos cada e por

uma imersão em água destilada durante 5 minutos. A coloração iniciou-se com a Hematoxilina de Harris (*Sigma - Aldrich*) por 1 minuto seguido de 10 minutos de água corrente, assim removendo o excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram coradas com Eosina (*Sigma - Aldrich*) por 3 minutos e desidratadas com etanol 95% e duas imersões de 5 minutos cada de etanol 100%. As fotos foram tiradas em aumento de 20x em microscópio de varredura (Leo 435 VP – *Zeiss, Oberkochen, Germany*).

3.11.2 Coloração por Luxol Fast Blue

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

3.12 Síntese de cDNA para PCR Array

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *RT² First Strand* (*Qiagen*). Para cada amostra, 2 µg de RNA foi adicionado a 2 µl de tampão 5x de eliminação de DNA genômico e água livre de RNase para um volume final de 10 µl. A reação foi incubada a 42°C por 10 min, e em seguida colocada rapidamente no gelo por pelo menos 1 minuto. A mistura de transcrição reversa foi preparada com 4 µl de tampão (5x *Buffer BC3*), 2 µl da mistura da enzima (*RE3 Reverse Transcriptase Mix*), 1 µl de controle para *primer* (*Control P2*) e 3 µl de água livre de RNase. Esta mistura foi adicionada aos 10 µl da reação para eliminação de DNA genômico e incubado a 42°C por 15 min. Em seguida foi incubado a 95°C por 5 min para bloqueio da reação. Após a incubação, foram adicionados 91 µl de água livre de RNase e a mistura foi estocada a -20°C até

ser realizado o PCR *array*. Todo o protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante.

3.13 PCR Array

Para a realização da *RT² PCR Array* (Qiagen) foi realizada previamente a transcrição reversa para a síntese de cDNA. O *RT² Profiler PCR Array* (Qiagen) é uma combinação da técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) e microarranjo que analisam vários genes simultaneamente. Para este trabalho foi utilizada a placa *Mouse Innate & Adaptive Immune Responses* (PAM-052ZA, Qiagen) representada no Quadro 1.

Quadro 1 - Genes representados na placa *Mouse Innate & Adaptive Immune Responses* PCR Array.

A1 <i>Apcs</i>	A2 <i>C3</i>	A3 <i>C5ar1</i>	A4 <i>Casp1</i>	A5 <i>Ccl12</i>	A6 <i>Ccl5</i>	A7 <i>Ccr4</i>	A8 <i>Ccr5</i>	A9 <i>Ccr6</i>	A10 <i>Ccr8</i>	A11 <i>Cd14</i>	A12 <i>Cd4</i>
B1 <i>Cd40</i>	B2 <i>Cd40lg</i>	B3 <i>Cd80</i>	B4 <i>Cd86</i>	B5 <i>Cd8a</i>	B6 <i>Crp</i>	B7 <i>Csf2</i>	B8 <i>Cxcl10</i>	B9 <i>Cxr3</i>	B10 <i>Ddxr8</i>	B11 <i>Fasl</i>	B12 <i>Foxp3</i>
C1 <i>Gata3</i>	C2 <i>H2-Q10</i>	C3 <i>H2-T23</i>	C4 <i>Icam1</i>	C5 <i>Ifna2</i>	C6 <i>Ifnar1</i>	C7 <i>Ifnb1</i>	C8 <i>Ifng</i>	C9 <i>Ifngr1</i>	C10 <i>Il10</i>	C11 <i>Il13</i>	C12 <i>Il17a</i>
D1 <i>Il18</i>	D2 <i>Il1a</i>	D3 <i>Il1b</i>	D4 <i>Il1r1</i>	D5 <i>Il2</i>	D6 <i>Il23a</i>	D7 <i>Il4</i>	D8 <i>Il5</i>	D9 <i>Il6</i>	D10 <i>Irak1</i>	D11 <i>Irf3</i>	D12 <i>Irf7</i>
E1 <i>Irgam</i>	E2 <i>Jak2</i>	E3 <i>Ly96</i>	E4 <i>Lyz2</i>	E5 <i>Mapk1</i>	E6 <i>Mapk8</i>	E7 <i>Mbl2</i>	E8 <i>Mpo</i>	E9 <i>Mx1</i>	E10 <i>Myd88</i>	E11 <i>Nfkb1</i>	E12 <i>Nfkbia</i>
F1 <i>Nlrp3</i>	F2 <i>Nod1</i>	F3 <i>Nod2</i>	F4 <i>Rag1</i>	F5 <i>Rorc</i>	F6 <i>Slc11a</i>	F7 <i>Stat1</i>	F8 <i>Stat 1</i>	F9 <i>Stat 3</i>	F10 <i>Stat6</i>	F11 <i>TBx21</i>	F12 <i>Ticam 1</i>
G1 <i>Tlr1</i>	G2 <i>Tlr2</i>	G3 <i>Tlr3</i>	G4 <i>Tlr4</i>	G5 <i>Tlr5</i>	G6 <i>Tlr6</i>	G7 <i>Tlr7</i>	G8 <i>Tlr8</i>	G9 <i>Tlr9</i>	G10 <i>Tnf</i>	G11 <i>Traf6</i>	G12 <i>Tyk2</i>
H1 <i>Actb</i>	H2 <i>B2m</i>	H3 <i>Gapdh</i>	H4 <i>Gusb</i>	H5 <i>Hsp90a</i>	H6 <i>MGDC</i>	H7 <i>RTC</i>	H8 <i>RTC</i>	H9 <i>RTC</i>	H10 <i>PPC</i>	H11 <i>PPC</i>	H12 <i>PPC</i>

Nesta placa estão incluídos 84 genes envolvidos em vias do sistema imune inato e adaptativo, cinco controles endógenos, um controle de eliminação de DNA genômico, três controles de transcrição reversa, três controles positivos da PCR. Para a realização do *PCR Array* foi utilizado o kit

RT² SYBR Green Mastermix do próprio fabricante da placa de *PCR Array* (Qiagen). O reagente para detecção utilizado foi o *SYBR Green*, que é um corante composto por uma molécula que emite fluorescência ao intercalar com DNA de dupla fita. Para preparar a mistura da reação de qRT PCR foram utilizados 1350 µl do “2x *RT² SYBR Green Mastermix*”, 102 µl da síntese de cDNA e 1248 µl de água livre de RNase. Foi utilizada a placa de 96 poços, e em cada poço foram adicionados 25 µl da mistura. O equipamento utilizado para detectar a expressão gênica foi o *Quant Studio3 (Applied Biosystems)* e as condições dos ciclos foram: um ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Cada placa detecta a expressão gênica de uma amostra a ser analisada. As reações foram realizadas com um *pool* de 10 animais para o grupo controle e 5 animais tratados com *htMSCs*.

3.14 Análise dos dados obtidos por *PCR Array*

A partir dos resultados obtidos da placa de *PCR Array*, para comparar a expressão de cada gene foi utilizado o *GeneGlobe Data Analysis Center* (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). A plataforma avaliou os dados e a expressão de cada gene foi calculada em relação aos controles endógenos gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) e proteína de choque térmico (*Hsp90ab1*). O cálculo da expressão gênica foi realizado pela fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ que fornece os valores de *fold change*, ou seja, quantas vezes um gene de um camundongo com EAE tratado com *htMSCs* é mais ou menos expresso em comparação ao grupo controle.

3.15 Análises estatísticas

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

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento, cultura e análise fenotípica das *htMSCs*

As amostras de tuba uterina foram obtidas e cultivadas conforme descrito por Jazedje et al., 2009. Após o processamento das amostras, também descrito nos materiais e métodos (3.2), a partir de três dias em cultura, quando é realizada a primeira troca do meio de cultivo, é possível identificar os primeiros nichos de *htMSCs* (Fig. 6A). Seis dias após o processamento (Fig. 6B), a cultura torna-se confluyente e dá-se início então, a expansão das células.

Para melhor caracterizar essas células e avaliar o potencial multipotente de nossas amostras, ou seja, a capacidade de se diferenciar em outros tecidos, submetemos a cultura primária de *htMSCs* a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica. Na diferenciação adipogênica, podemos observar acúmulo de vesículas ricas em lipídeo (Fig. 6 D e E). A diferenciação condrogênica é caracterizada pela presença da matriz extracelular mucopolissacarídica em roxo (Fig. 6 G) e, por fim, a diferenciação osteogênica é evidenciada pelo acúmulo de cálcio demonstrado pela coloração mais escura.

Além da diferenciação multilinhagem, caracterizamos as *htMSCs* pela expressão de diferentes marcadores de superfície. Como demonstrado na figura 7 e Tabela 1, as células mostram um fenótipo característico de *MSC*, apresentando alta expressão dos marcadores CD29, CD44, CD73, CD90 e HLA-ABC, e baixa expressão dos marcadores CD14, CD31, CD45 e HLA-DR. Dessa forma, concluímos que as *htMSCs* constituem uma população fenotípica característica de *MSC* para ser utilizada em nossos experimentos.

Figura 6 – Isolamento, cultura e diferenciação de *htMSCs*. Amostras de tuba uterina foram processadas para obtenção e isolamento de *htMSCs in vitro*. *htMSCs* cultivadas (A) 3 dias e (B) 6 dias após processamento foram submetidas a diferenciação (C,D e E) Adipogênica, (F e G) Condrogênica e (H e I) Osteogênica. C, F e H representam os controles. Diferenciação Adipogênica (C,D e E) coloração *Oil Red*; acúmulo de vesículas ricas em lipídeo pode ser observada em vermelho. Diferenciação Condrogênica (F e G) - Azul de Toluidina; observa-se matriz extracelular mucopolissacarídica em roxo. Diferenciação Osteogênica - coloração *Alizarin Red*; o acúmulo de cálcio é demonstrado pela coloração mais escura (setas).

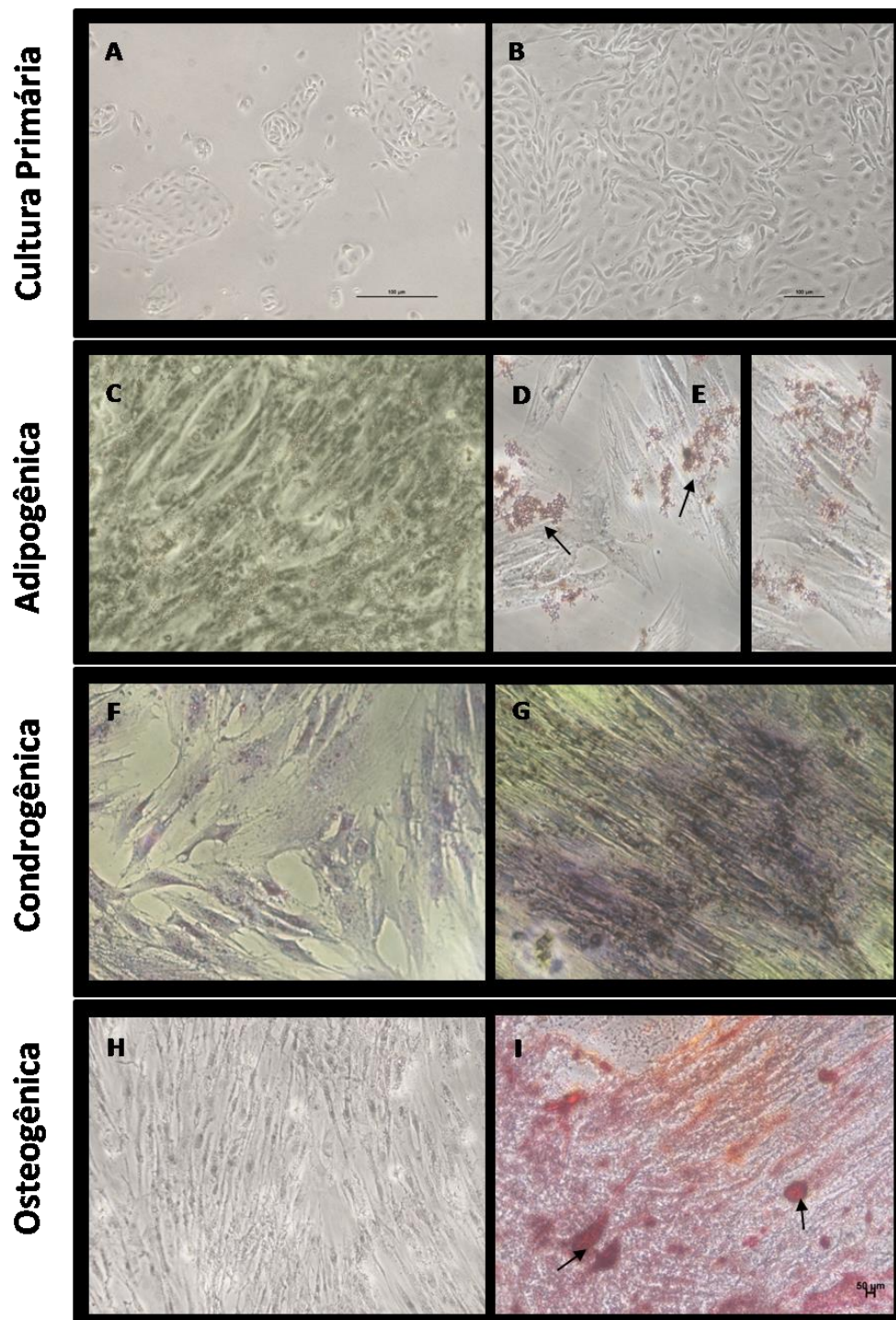


Figura 7 – Caracterização fenotípica das *htMSCs*. *htMSCs* obtidas e cultivadas conforme descrito em materiais e métodos foram submetidas a análise por citometria de fluxo para a expressão de CD14, CD29, CD31, CD44, CD45, CD73, CD90, HLA-ABC e HLA-DR. O controle não marcado é representado em vermelho.

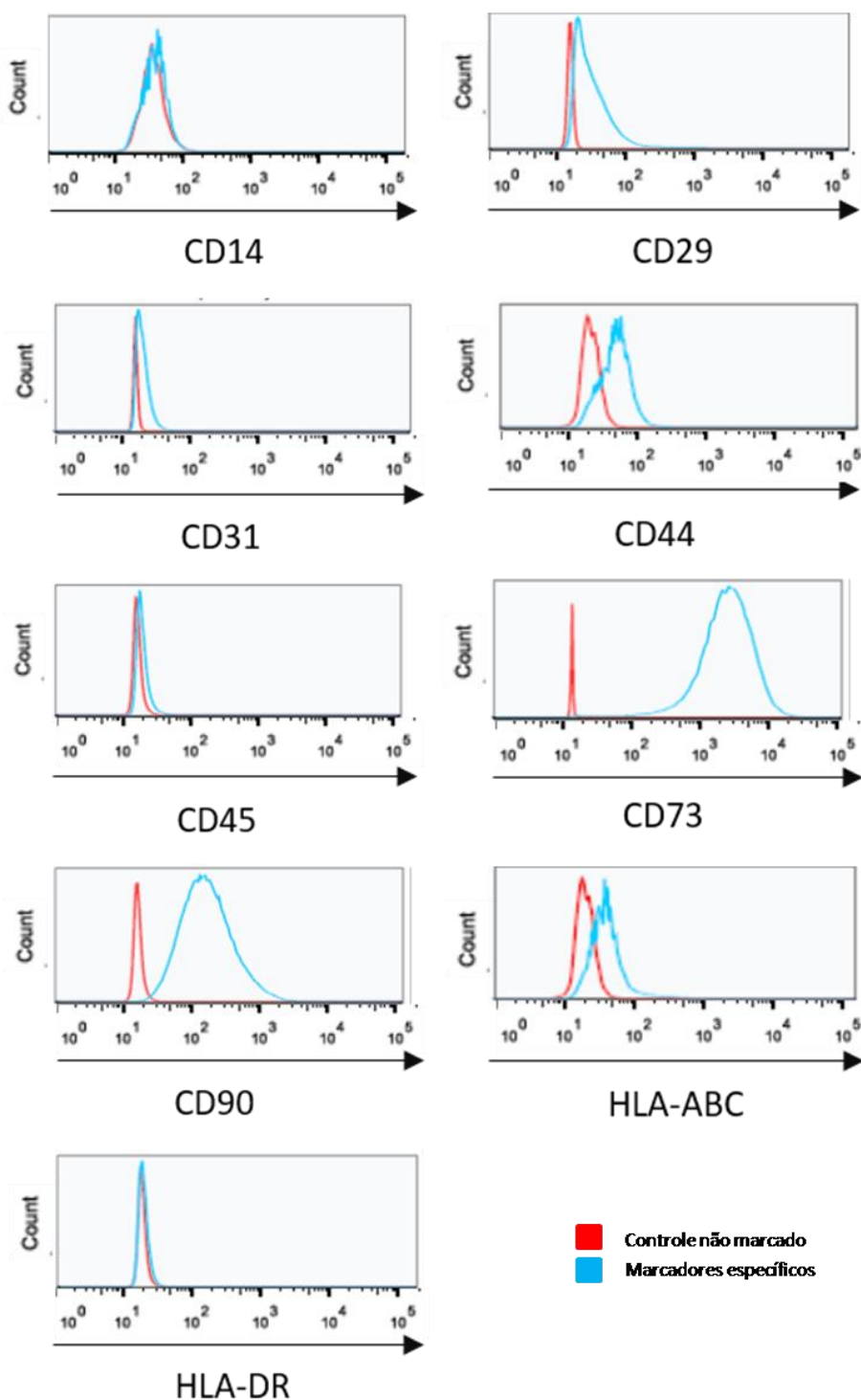


Tabela 1 – Dados numéricos de *htMSCs* positivas para os marcadores citados na figura 7.

Marcadores	Especificidade	% de células marcadas
CD14	Marcador de monócito	0,89
CD29	Marcador específico de MSC/Aderência	95,47
CD31	Marcador Endotelial	3,95
CD44	Marcador específico de MSC/ Aderência	94,95
CD45	Marcador de células tronco hematopoiéticas	1,68
CD73	Marcador específico de MSC	99,69
CD90	Marcador específico de MSC/Aderência	98,42
HLA-ABC	MHC de classe I	94,15
HLA-DR	MHC de classe II	1,83

4.2 O tratamento com *htMSCs* reduz o *score* da EAE *in vivo* a longo prazo

4.2.1 As *htMSCs* são capazes de reduzir a progressão da EAE

Uma vez caracterizadas, nosso próximo passo foi avaliar o efeito modulatório *in vivo* das *htMSCs*. Nosso grupo demonstrou que *hedMSCs* possuem um potente efeito imunomodulatório *in vivo* (Peron, Jazedje et al. 2012). Para investigar o potencial das *htMSCs* de modularem a progressão da EAE *in vivo*, camundongos C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅, conforme descrito em material e métodos (3.4), receberam uma dose de *htMSC* no mesmo dia da imunização (dia 0). Os animais foram acompanhados diariamente e o *score* clínico foi avaliado até o dia 30.

A figura 8 A e B demonstra que os camundongos que receberam o tratamento com *htMSCs* apresentaram uma redução bastante significativa no *score* clínico da EAE durante todo o período. Na tabela 2, podemos observar que o *score* clínico do grupo tratado é menor do que o do grupo controle na fase inicial do surgimento dos sintomas (dias 10 ao dia 13), no pico da doença (dias 14 a 18) e na fase de remissão (dias 20 a 30), indicando que as *htMSCs* foram capazes de diminuir a progressão da doença *in vivo*.

Tabela 2 - Média do score clínico de animais com EAE tratados com apenas uma dose de *htMSCs* no dia 0.

Média de Score	Controle	htMSCs
Fase Inicial	1.02 ± 0,95	0,25 ± 0,44
Pico	3,60 ± 0,45	2,15 ± 1,18
Remissão	2,80 ± 0,30	1,12 ± 0,69

4.2.2 O tratamento com *htMSCs* reduz a neuroinflamação e danos histopatológicos no cérebro e medula espinhal de animais com EAE

As medulas espinhais dos animais tratados ou não com *htMSCs* foram submetidas aos protocolos de coloração para HE e *Luxol Fast blue* para análise de infiltrado inflamatório e desmielinização, respectivamente, uma vez que esses achados são característicos do desenvolvimento da EAE. Podemos observar que houve diminuição no infiltrado inflamatório na medula espinhal (Fig. 8 C) de animais tratados com *htMSCs*. O mesmo ocorreu quanto à desmielinização, onde observa-se que os animais tratados apresentaram uma menor desmielinização na medula espinhal (Fig. 8 C).

4.2.3 As *htMSCs* inibem a transcrição de genes pró-inflamatórios dos linfócitos patogênicos e induzem a transcrição de genes imunomodulatórios

Ainda, no 30^o dia pós-imunização, as medulas espinhais dos animais tratados ou não com *htMSCs* foram obtidas e analisadas quanto à expressão de diversos genes. Observamos que o tratamento com *htMSCs* diminuiu a expressão dos genes *Ifng* e *Il17* (Fig. 8 D e F), os quais são relacionados às citocinas produzidas pelas populações de linfócitos T patogênicos Th1 e Th17 na EAE, respectivamente. A expressão dos genes *Tbx21* (Fig. 8 E), fator de transcrição das células Th1, e *RorC* (Fig. 8 G), fator de transcrição das células Th17 também foram diminuídos.

Observamos também que não houve um aumento significativo na expressão do gene do fator de transcrição de células T reguladoras *Foxp3* (Fig.

8 H), na expressão do gene *Bdnf* (Fig 8 I), fator neurotrófico envolvido no desenvolvimento e função das células nervosas e do gene *Il27* (Fig. 8 J), fator de transcrição da citocina IL 27, a qual foi descrita recentemente como inibidora de linfócitos Th17. Ainda, o tratamento aumentou a expressão do gene da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), conhecida por sua função imunomoduladora por limitar a função de células T (Fig 8. K). Com esses resultados, concluímos que as *htMSCs* possuem um efeito imunomodulatório *in vivo* na EAE e, que esse efeito ocorre de forma duradoura.

4.2.4 O tratamento com duas doses de *htMSCs* é mais efetivo em reduzir a progressão da EAE.

A fim de tentar aumentar o efeito imunomodulador observado nas *htMSCs*, testamos uma estratégia terapêutica na qual os animais receberam a primeira dose de células tronco no dia da imunização (dia 0) e, uma segunda dose, ambas por via intra-peritoneal, no 10^o dia pós-imunização. De fato, a segunda dose contribuiu para uma maior inibição da progressão da doença (Fig 9 A, B), uma vez que a média do *score* dos animais tratados com duas doses de *htMSCs* no pico da doença é menor que a média dos animais tratados com apenas uma dose (Tabela 3).

Tabela 3 - Média do score clínico de animais com EAE tratados com duas doses de *htMSCs* nos dias 0 e 10 pós-imunização.

Média de Score	Controle	<i>htMSCs</i>
Fase Inicial	1,36 ± 1,14	0,20 ± 0,35
Pico	3,60 ± 0,43	1,82 ± 1,33
Remissão	2,82 ± 0,33	1,45 ± 0,88

Finalmente, para avaliarmos se o tratamento teria efeito inibitório se realizado na fase inicial do surgimento dos sintomas, realizamos o tratamento com *htMSCs* apenas no 10^o dia pós-imunização. Curiosamente, observamos uma redução não significativa no *score* dos animais tratados (Fig. 9 C, D) durante todo o percurso da doença (Tabela 4).

Figura 8 – O tratamento com *htMSCs* reduz o score clínico da EAE *in vivo*, reduz a neuroinflamação e danos histopatológicos e modula a expressão gênica na medula espinhal. Camundongos C57BL/6 que receberam MOG₃₅₋₅₅ (150µg/animal) emulsificado em CFA (v/v), contendo *M. tuberculosis* H37 (100µg/animal), foram tratados ou não com *htMSCs* (1x10⁶ células/animal) via intra-peritoneal no dia 0. **(A)** Os animais (n= 8 por grupo) foram analisados em relação ao *score clínico* da doença diariamente até o dia 30. **(B)** mostra o valor da área sob a curva do grupo tratado e não tratado. No dia 30, a medula espinhal foi obtida e corada com **(C)** HE para analisar células infiltrantes e *Luxol fast blue* para analisar desmielinização. O mRNA total da da parte distal da medula espinhal foi obtido e analisado por RT-PCR em relação a expressão dos genes **(D)** *Ifng*, **(E)** *Tbx21*, **(F)** *IL-17a*, **(G)** *Rorc*, **(H)** *Foxp3*, **(I)** *Bdnf*, **(J)** *Il27* e **(K)** *Ido*. Os dados foram normalizados com o gene da β -actina e comparados ao grupo Controle. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística T test e *Two way* ANOVA, *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e ****p < 0,0001 em relação ao controle.

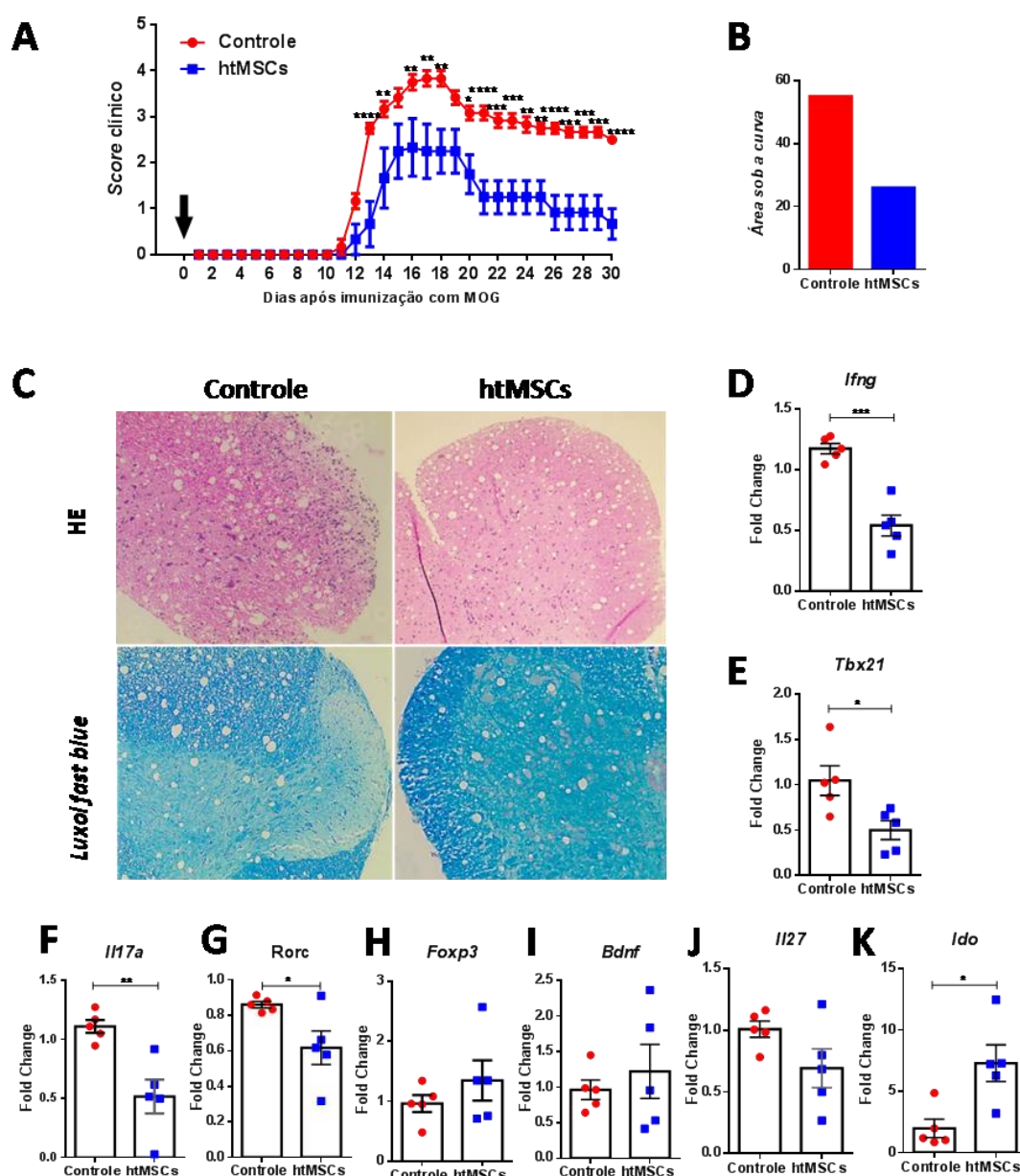


Figura 9 – O tratamento com duas doses de *htMSCs* é mais efetivo em reduzir o score clínico da EAE *in vivo*. Camundongos C57BL/6 que receberam MOG₃₅₋₅₅ (150µg/animal) emulsificado em CFA (v/v), contendo *M. tuberculosis* H37 (100µg/animal) foram tratados ou não com *htMSCs* (1x10⁶ células/animal) via intra-peritoneal no dia 0 e dia 10, ou somente no dia 10. **(A, C)** Os animais (n= 10 por grupo) foram analisados em relação ao score clínico da doença diariamente até o dia 30. **(B, D)** Mostra o valor da área sob a curva do grupo tratado e não tratado. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística *Two way ANOVA*, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 em relação ao controle.

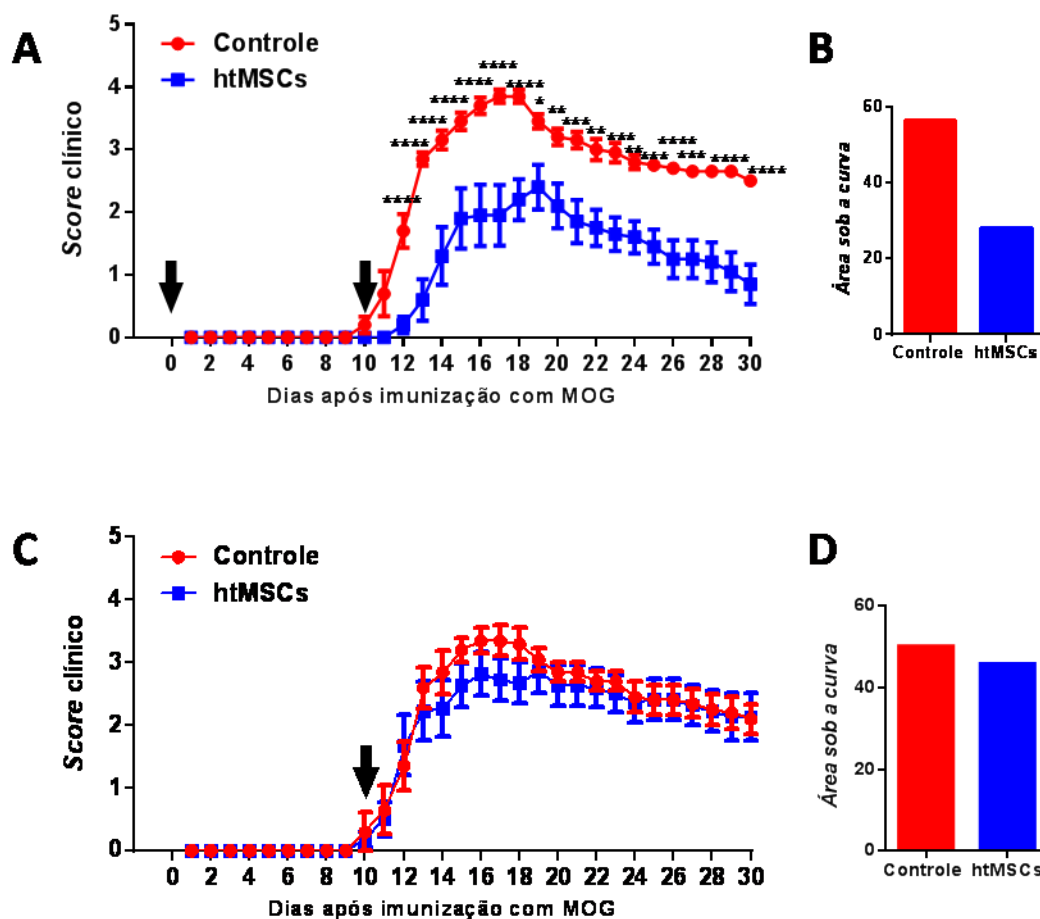


Tabela 4 - Média do score clínico de animais com EAE tratados com apenas uma dose de *htMSCs* no dia 10 pós imunização.

Média de Score	Controle	<i>htMSCs</i>
Fase Inicial	1,53 ± 1,24	1,47 ± 1,39
Pico	3,21 ± 0,65	2,63 ± 0,87
Remissão	2,48 ± 0,44	2,40 ± 0,82

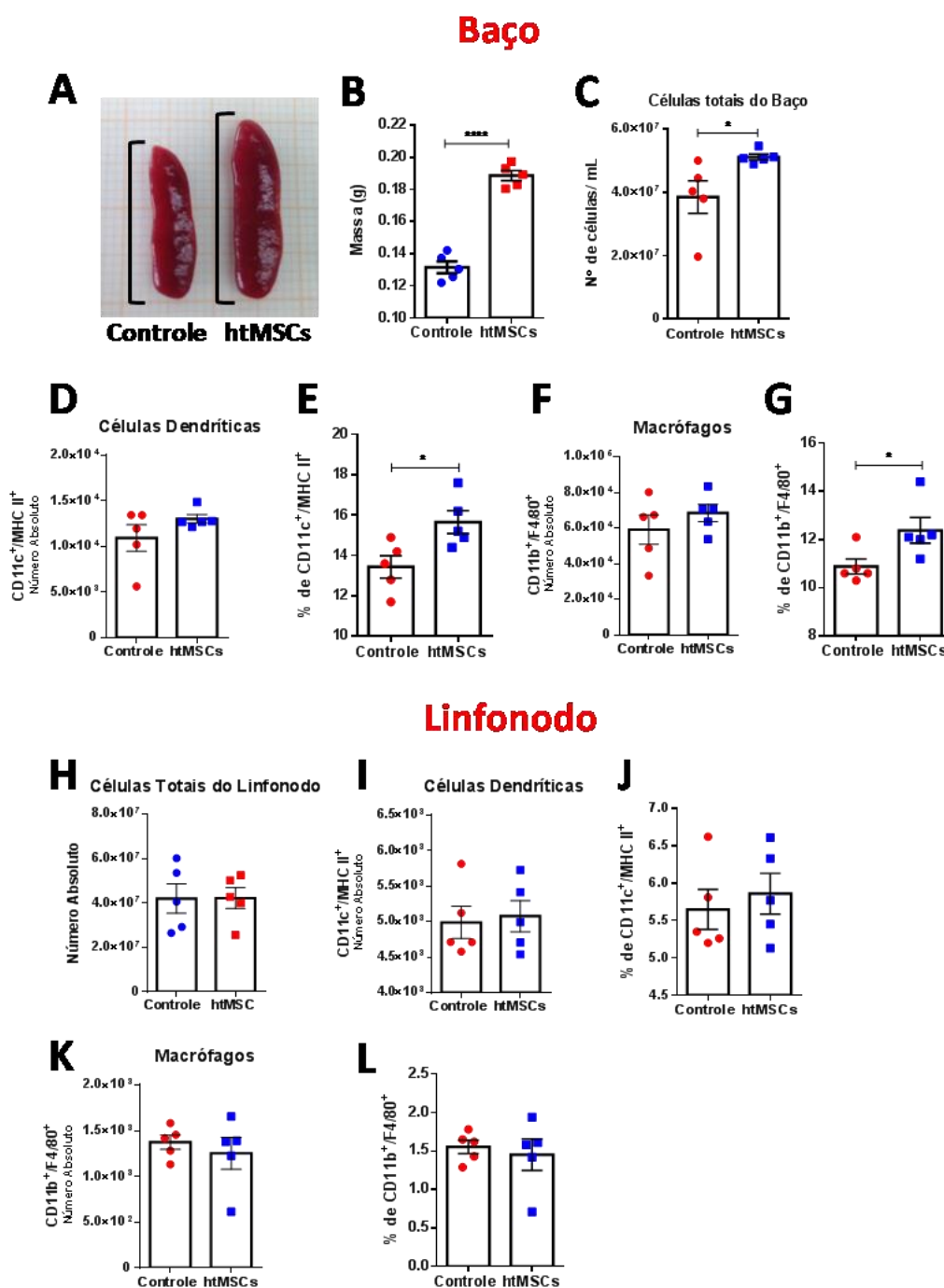
4.3 Avaliação da Imunomodulação das *htMSCs* durante o estabelecimento da EAE na periferia

4.3.1 Perfil de macrófagos e células dendríticas no baço e linfonodo durante o estabelecimento da EAE na periferia

O desenvolvimento da EM e da EAE ocorre inicialmente por linfócitos T auto-reativos aos epítomos de mielina que são ativados nos tecidos linfáticos periféricos e que, subseqüentemente, infiltram o SNC (Pettinelli and McFarlin 1981). Sendo assim, tivemos interesse em buscar o papel imunomodulatório das *htMSCs* nos estágios iniciais do estabelecimento da doença na periferia. Para isso, C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅, receberam uma dose de *htMSCs* no mesmo dia da imunização.

No sétimo dia pós-imunização, foram obtidos os baços e linfonodos inguinais e periaórtico desses animais, os quais foram analisados por citometria de fluxo quanto à frequência e número absoluto das populações de macrófagos (F4/80⁺ CD11b⁺) e células dendríticas (CD11c⁺ MHC II⁺) presentes no baço e linfonodos (Fig. 10). No baço, pudemos observar um aumento do tamanho (Fig. 10 A), da massa do órgão (Fig. 10 B) e do número de células totais no baço de animais do grupo tratado (Fig. 10 C). Quanto às populações das células apresentadoras de antígenos, houve um aumento significativo na frequência de células dendríticas (Fig. 10 E) e macrófagos (Fig. 10 G) no baço dos animais que receberam *htMSCs*. No linfonodo, por outro lado, não observamos diferença no número de células totais (Fig.10 H) ou no número total e frequência de células dendríticas (Fig. 10 I e J) e macrófagos (Fig. 10 K e L).

Figura 10 – Perfil de células dendríticas e macrófagos no baço e linfonodos de animais com EAE 7 dias pós-imunização. (A) Comparação do tamanho e **(B)** massa do baço entre o grupo controle e tratado. Células totais do baço **(C)** e linfonodos inguinais e periaórticos **(H)** foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no 7^o dia pós-imunização (n= 5 por grupo) e foram submetidas a análise por citometria de fluxo quanto a frequência e número absoluto das populações de células dendríticas (CD11c⁺ MHC II⁺) **(D, E, I e J)** e macrófagos (F4/80⁺ CD11b⁺) **(F, G, K e L)**. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística *T test*, *p < 0,05 e **** p < 0,0001 em relação ao controle.



4.3.2 *htMSCs* modulam a apresentação de antígenos e ativação de macrófagos e células dendríticas no linfonodo de animais no início da EAE

As células apresentadoras de antígenos são imprescindíveis para o início da resposta imune, sendo assim, com o objetivo de verificar se as *htMSCs* conseguiriam modular a ativação de macrófagos e células dendríticas durante o início da EAE na periferia, analisamos a expressão da molécula de MHC II e das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 dessas células no baço e linfonodo dos animais tratados e não tratados 7 dias pós-imunização.

Nos macrófagos do baço, não observamos modulação na expressão das moléculas CD86 (Fig. 11 A), CD80 (Fig. 11 B) e MHC II (Fig. 11 C). Nos linfonodos, porém, apesar de não alterar a frequência e número absoluto da população de macrófagos, o tratamento com as *htMSCs* foi capaz de modular a expressão de CD86 (Fig. 11 D), CD80 (Fig. 11 E) e MHC II (Fig. 11 F), reduzindo a expressão das mesmas nos animais tratados.

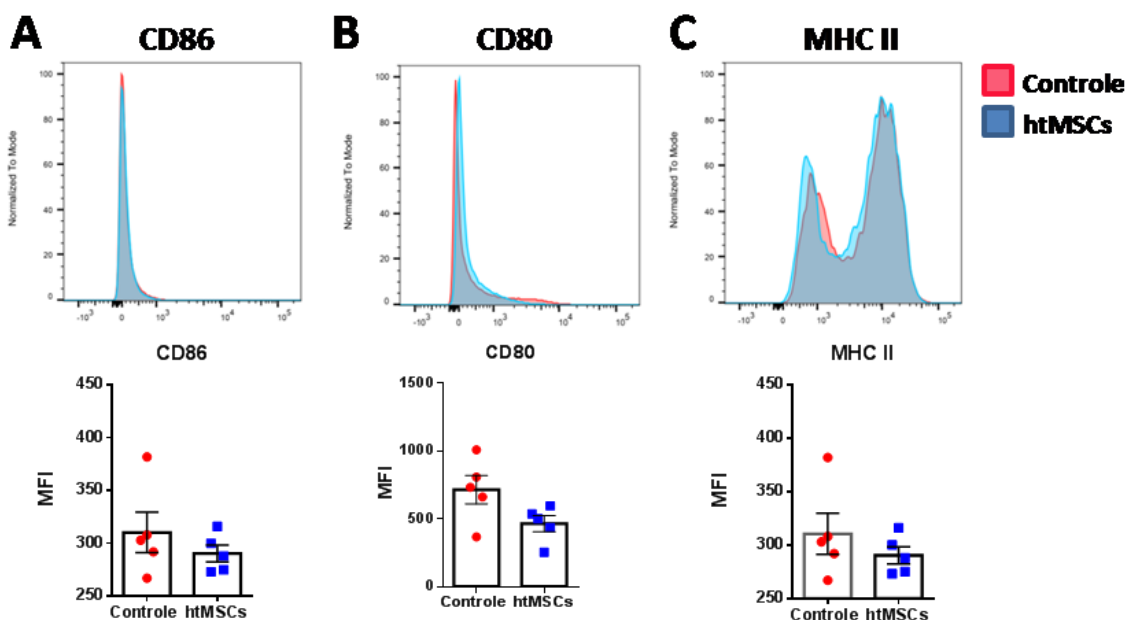
Nas células dendríticas, observamos um efeito maior da modulação das *htMSCs*, uma vez que tanto as populações de células dendríticas do baço quanto do linfonodo tiveram a expressão das moléculas CD86 (Fig.12 A e D), CD80 (Fig. 12 B e E) e MHC II (Fig. 12 C e F) diminuída no grupo de animais tratados. Podemos concluir, assim, que o tratamento com *htMSCs* consegue, de alguma forma, modular a apresentação de antígeno e a ativação de células dendríticas no baço e linfonodo dos animais tratados.

4.3.3 *htMSCs* reduzem a população de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo de animais no início da EAE

Além de macrófagos e células dendríticas, nos interessamos em analisar as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço e linfonodos dos camundongos tratados com *htMSCs* durante o estabelecimento da EAE. Para isso, os esplenócitos totais e células totais do linfonodo extraídos no 7^o dia pós-imunização foram re-estimuladas ou não *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ conforme material e métodos (3.10.3) e analisados por citometria de fluxo em relação a

Figura 11 – Expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC II é reduzida em macrófagos ($F4/80^+CD11b^+$) nos linfonodos de animais com EAE tratados com *htMSCs*. Células do baço e linfonodos inguinais e periaórticos foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no 7^o dia pós-imunização (n=5 por grupo) e foram submetidas a análise por citometria de fluxo da expressão das moléculas de superfície celular (A, D) CD86, (B, E) CD80 e (C, F) MHC II na população de macrófagos. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística *T test* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

Macrófagos Baço



Macrófagos Linfonodo

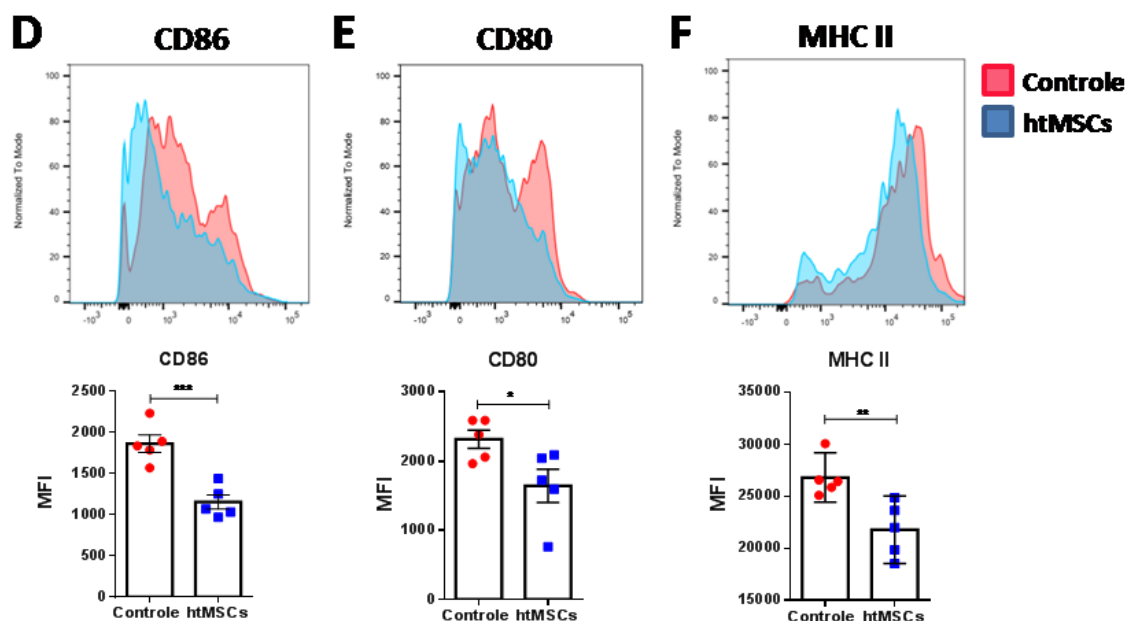
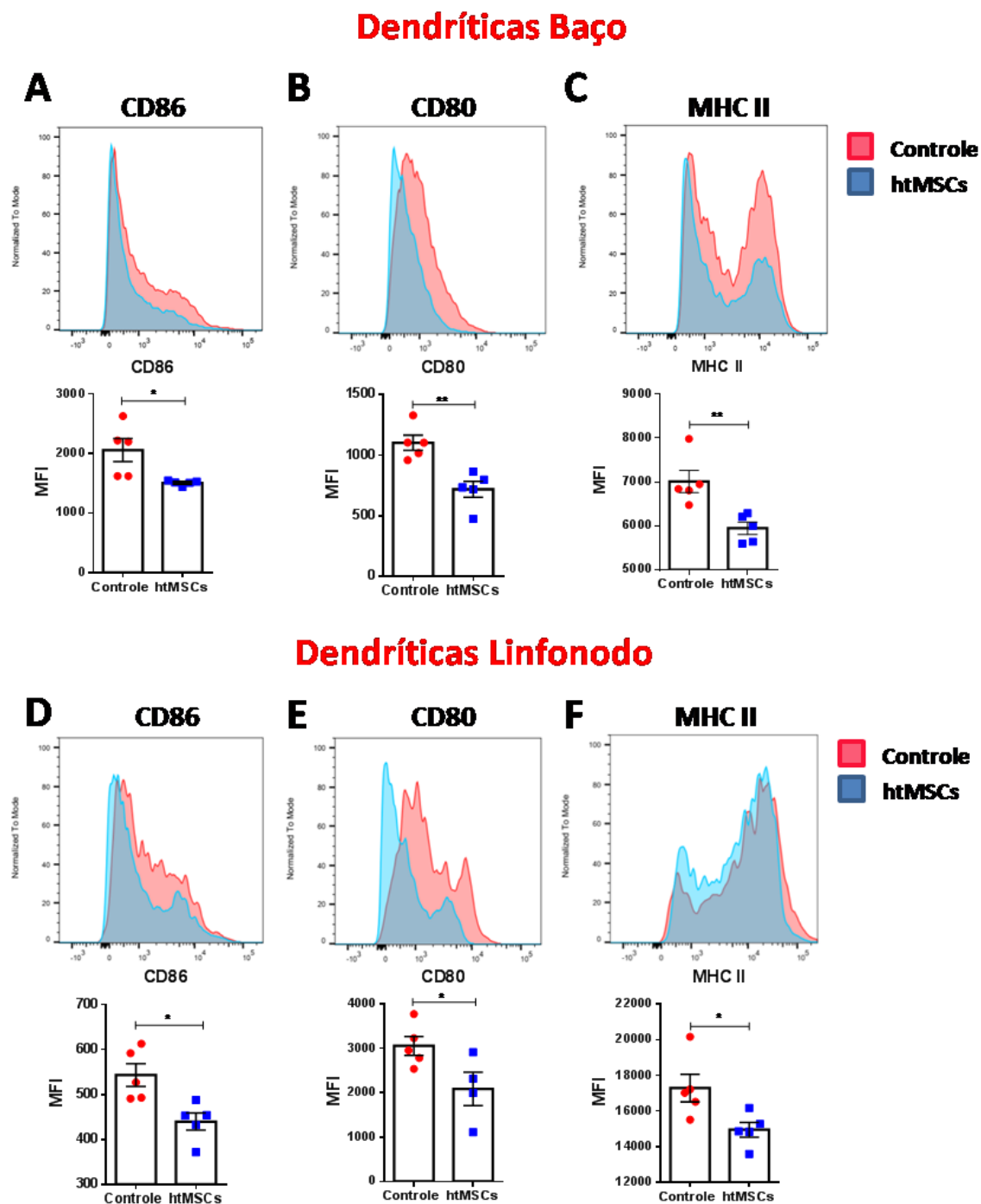


Figura 12 – Expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC II é reduzida em células dendríticas (CD11c⁺MHC II⁺) nos linfonodos de animais com EAE tratados com *htMSCs*. Células do baço e linfonodos inguinais e periaórticos foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no 7^o dia pós-imunização (n=5 por grupo) e foram submetidas a análise por citometria de fluxo da expressão das moléculas de superfície celular (**A, D**) CD86, (**B, E**) CD80 e (**C, F**) MHC II na população de células dendríticas. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística *T test* * p < 0,05; ** p < 0,01 em relação ao controle.



expressão de CD4 e CD8.

A Figura 13 mostra um pequeno aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ no baço dos animais tratados com *htMSCs* (Fig. 13 B), enquanto não houve alteração na frequência ou número absoluto (Fig. 13 C, D) de linfócitos T CD8⁺. Nos linfonodos, por outro lado, observamos uma redução do número absoluto e da frequência de linfócitos T CD4⁺ (Fig. 13 E, F) e T CD8⁺ (Fig 13 G, H) no grupo tratado.

Sendo linfócitos Th1 e Th17 as principais subpopulações da patologia da EAE, as quais são caracterizadas pela produção das citocinas IFN- γ e IL-17, respectivamente, o próximo passo foi analisar o perfil de citocinas dos grupos tratado e não tratado. Para isso, os esplenócitos totais e células totais do linfonodo extraídos no 7^o dia pós-imunização foram re-estimuladas ou não *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ e α -CD3. Após 72 horas de cultivo o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas por citometria de acordo com materiais e métodos (3.10.4).

No baço, apesar de conseguir modular a produção da citocina IFN- γ (Fig. 14 A), não houve modulação das citocinas inflamatórias IL-17, IL-6 e TNF (Fig. 14 C, G, I). No linfonodo, o tratamento com as *htMSCs*, além de modular o perfil de linfócitos T CD4⁺ conforme visto no resultado anterior (Fig. 13 E, F), foi capaz de modular a produção das citocinas IFN- γ e IL-17 (Fig. 14 B, D), características das subpopulações dos linfócitos Th1 e Th17, respectivamente, porém, não observamos modulação nas citocinas inflamatórias IL-6 e TNF (Fig. 14 H, J). Por fim, surpreendentemente, o re-estímulo com MOG₃₅₋₅₅ elevou os níveis de secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 nos animais tratados em relação aos controles no baço (Fig. 14 E) e linfonodo (Fig. 14 F).

Dessa forma, podemos concluir que o tratamento com *htMSCs* é capaz de reduzir linfócitos Th1 e Th17 nos linfonodos de animais tratados e causar o aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 no baço e linfonodo dos animais tratados em relação ao grupo controle, porém, não foi o suficiente

Figura 13 – A população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ é reduzida nos linfonodos de animais tratados com *htMSCs* nos estágios iniciais da EAE. Células do baço e linfonodos inguinais e periaórticos foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no 7^o dia pós-imunização (n=5 por grupo) e foram re-estimuladas *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (1 µg/mL) por 12 h e PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µg/mL) 4h. As células foram submetidas a análise por citometria de fluxo das moléculas de superfície celular (**A e B, E e F**) CD4⁺ e (**C e D, G e H**) CD8⁺. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística Two way ANOVA, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 em relação ao controle.

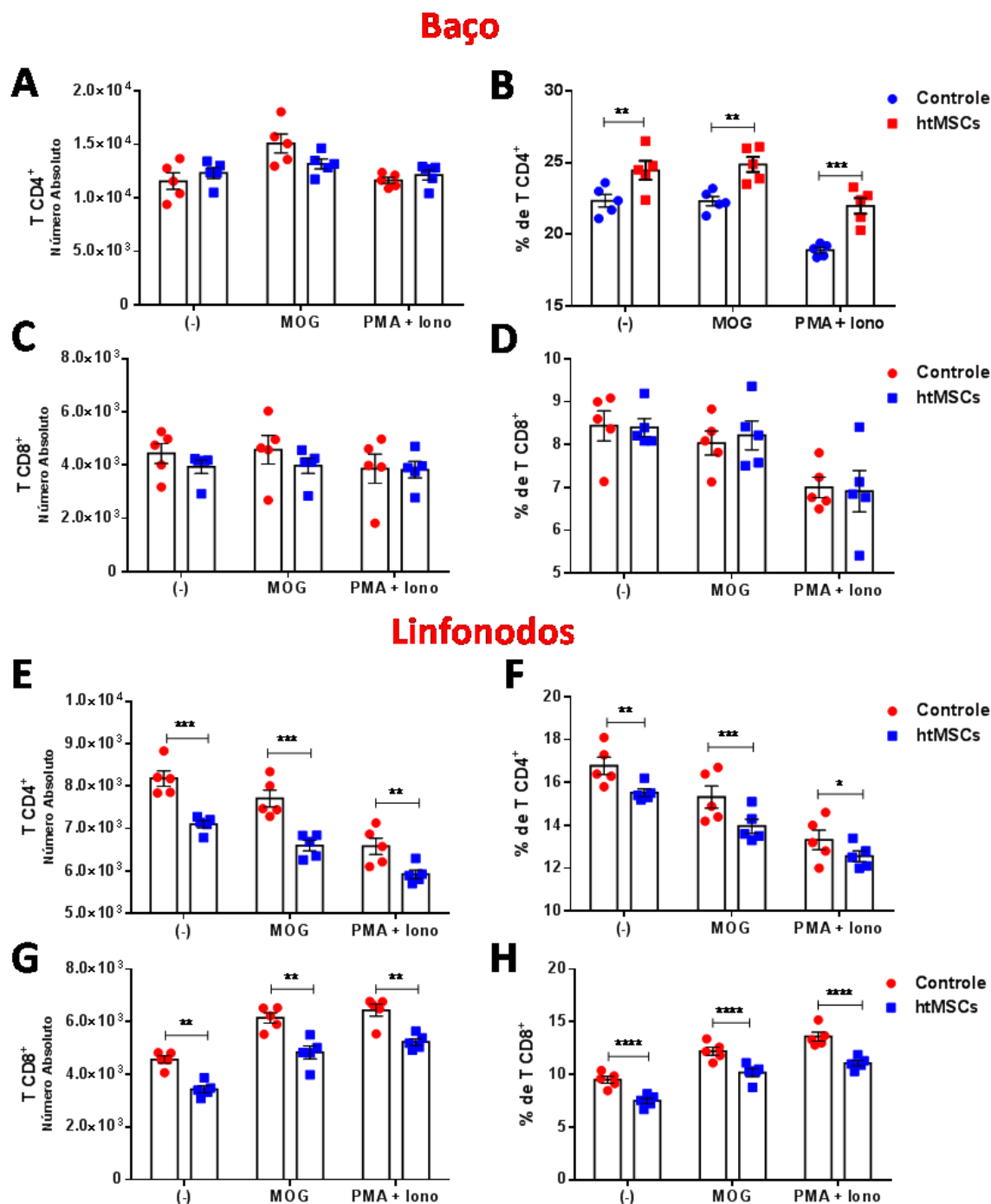
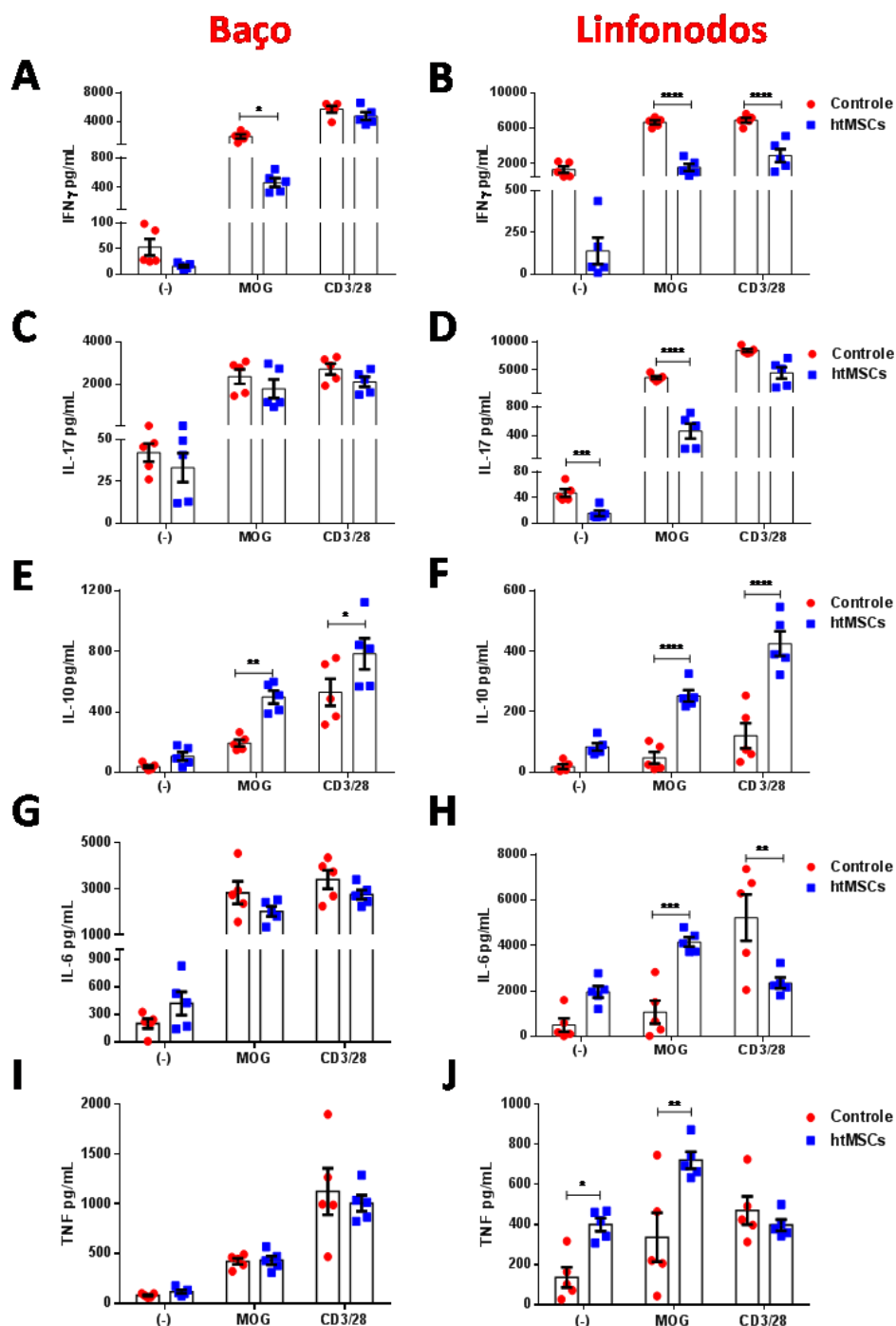


Figura 14 – Perfil de citocinas do baço e linfonodos de animais tratados com *htMSCs* 7 dias pós-imunização e após re-estimulação *in vitro* com MOG. Células do baço e linfonodos inguinais e periaórticos foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no 7^o dia pós-imunização (n=5 por grupo) e foram obtidos, processados e re-estimulados *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (1 µg/mL) e α-CD3 (1 µg/mL); Após 72 horas o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística *Two way ANOVA*, * p<0,05; ** p < 0,01; *** p <0,001 e **** p < 0,0001 em relação ao controle.



para reduzir a inflamação na periferia, uma vez que não houve diferença nos níveis das citocinas IL-6 e TNF- α .

4.4 Avaliação da Imunomodulação das *htMSCs* durante o pico da EAE na periferia

4.4.1 Perfil de macrófagos e células dendríticas no baço durante o pico da EAE na periferia

Uma vez que o tratamento com duas doses de *htMSCs* foi mais efetivo em diminuir os sintomas clínicos nos animais (Fig. 9 A, B), continuamos com essa estratégia para os experimentos seguintes. Agora com foco na fase efetora da doença, C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ receberam uma dose de *htMSCs* no dia da imunização (dia 0), uma segunda dose no dia 10 pós-imunização e foram acompanhados diariamente até o dia 16. Observamos que o tratamento reduziu significativamente o *score* dos animais tratados em comparação ao grupo controle e reduziu a progressão da doença *in vivo* (Fig. 15 A, B).

No pico da doença, continuamos a observar diferença no tamanho (Fig. C) e massa (Fig. D) dos baços dos animais tratados e não tratados. Quanto ao perfil celular, apesar de observarmos aumento do número total de células no grupo tratado (Fig. 15 E), não houve diferença no número total e frequência de células dendríticas (Fig. 15 F, G) e macrófagos (Fig. H, I). Com o objetivo de avaliar se o tratamento continuaria a modular a apresentação de antígenos e ativação das células dendríticas durante a fase efetora da doença, analisamos novamente a expressão das moléculas co-estimuladoras CD86, CD80 e MHC II, das quais, somente as moléculas CD86 (Fig. 16 A) e CD80 (Fig. 16 B) foram moduladas de modo significativo pelo tratamento com *htMSCs*. Não observamos modulação significativa nos macrófagos do baço.

Dessa forma, concluímos que as *htMSCs* conseguem modular a ativação de células dendríticas no baço de animais tratados durante o pico da EAE.

Figura 15 – O tratamento com htMSCs reduz a progressão da EAE in vivo, mas não modula o perfil de células dendríticas e macrófagos no baço de animais com EAE 16 dias pós-imunização. Camundongos C57BL/6 que receberam MOG 35-55 (150µg/animal) emulsificado em CFA (v/v), contendo *M. tuberculosis* H37 (100µg/animal) foram tratados ou não com *htMSCs* (1×10^6 células/animal) via intra-peritoneal no dia 0 e dia 10. **(A)** Os animais ($n = 7$ por grupo) foram analisados em relação ao *score* clínico da doença diariamente até o dia 16. **(B)** Mostra o valor da área sob a curva do grupo tratado e não tratado. **(C)** Comparação do tamanho e **(D)** massa do baço entre o grupo controle e tratado. Células do baço foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no 16º dia pós-imunização ($n = 5$ por grupo) e foram submetidas a análise por citometria de fluxo quanto **(E)** número de células totais, frequência e número absoluto das populações de células dendríticas ($CD11c^+ MHC II^+$) **(F, G)** e macrófagos ($F4/80^+ CD11b^+$) **(H, I)**. Dados representativos de três experimentos independentes. Análise Estatística *T test*, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

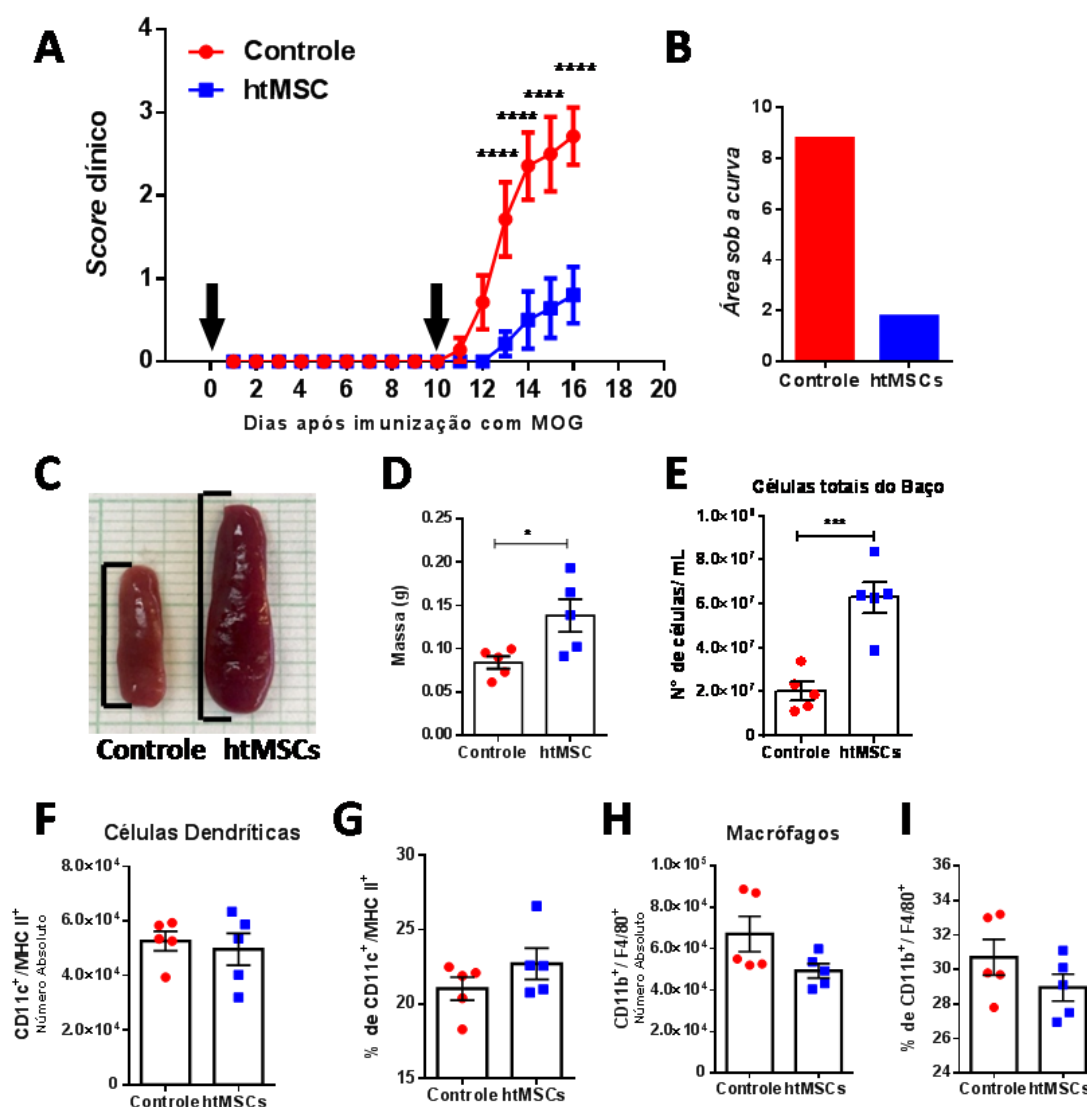
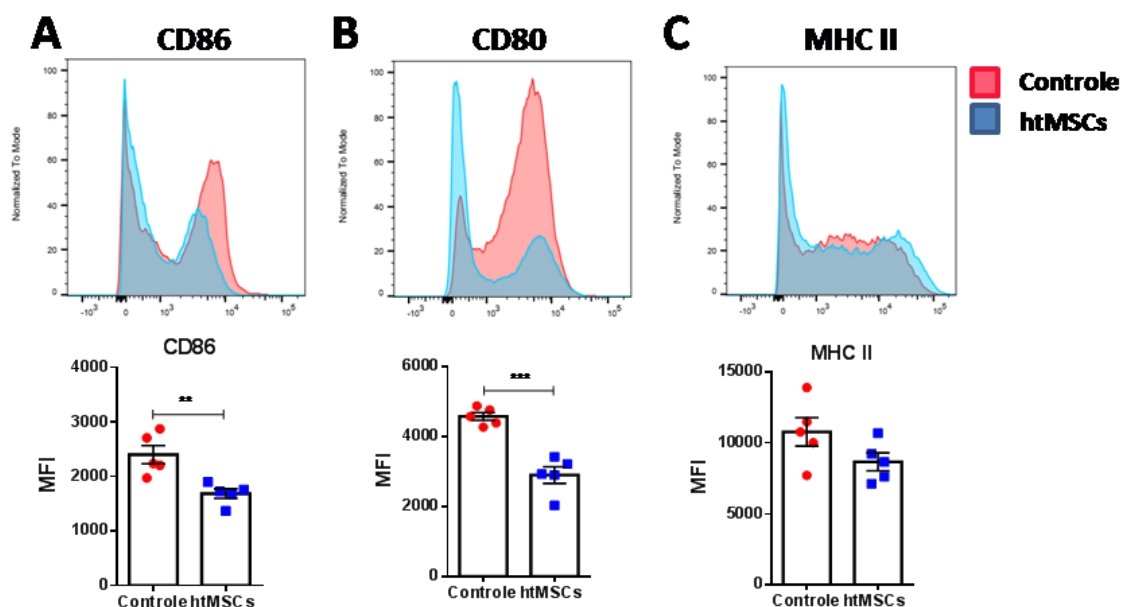
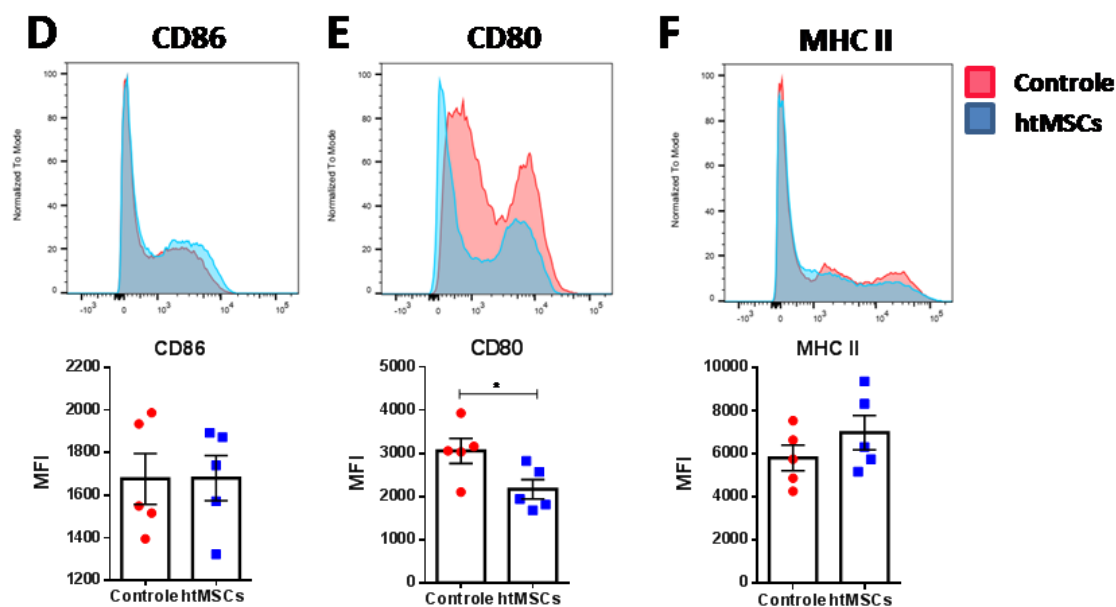


Figura 16 – Expressão das moléculas CD86, CD80 é reduzida em células dendríticas (CD11c⁺MHC II⁺) durante o pico da doença nos baços de animais com EAE tratados com *htMSCs*. Células do baço foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no dia da imunização e no 16^o dia pós-imunização (n=5 por grupo) e foram submetidas a análise por citometria de fluxo da expressão das moléculas de superfície celular (**A, D**) CD86, (**B, E**) CD80 e (**C, F**) MHC II na população de células dendríticas e macrófagos. Dados representativos de três experimentos independentes. Análise estatística *T test* * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 em relação ao controle.

Dendríticas Baço



Macrófagos Baço



4.4.2 *htMSCs* não conseguem modular a população de linfócitos T CD4⁺ no baço de animais durante o pico da EAE na periferia.

Com o objetivo de analisar novamente as populações de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ no baço dos animais tratados com *htMSCs*, agora no pico da doença, os esplenócitos totais extraídos no 16^o dia pós-imunização, foram re-estimulados ou não *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ conforme material e métodos (3.10.3) e analisados por citometria de fluxo em relação a expressão de CD4 e CD8. Observamos mudanças apenas nas frequências de linfócitos T CD4⁺ (Fig. 17 B) e T CD8⁺ (Fig. 17 D).

Analisamos também as populações de linfócitos Th1 (T CD4⁺IFN- γ ⁺) e Th17 (T CD4⁺IL-17⁺) no baço, porém, não houve diferença da frequência ou número absoluto dos mesmos (Fig. 17 E,F, G, H) entre os grupos tratado e controle. Esses dados são corroborados pela análise do perfil de citocinas desses linfócitos, uma vez que a segunda dose de *htMSCs* não conseguiu modular a produção de INF- γ (Fig 18 A) e IL-17 (Fig 18 B). Também não houve modulação das citocinas IL-6 (Fig. 18 D) e TNF- α (Fig. 18 E). Apenas a citocina IL-10 teve um aumento de produção frente ao tratamento com *htMSCs*, conforme observado no início do estabelecimento da EAE (Fig. 14 E).

Coletivamente, os dados demonstram que, no pico da doença, o tratamento com as duas doses de *htMSCs*, apesar de aumentar a inibição da progressão da EAE *in vivo*, não é capaz de inibir ou reduzir a secreção das citocinas dos perfis patogênicos da doença, Th1 e Th17, no baço de animais tratados em relação ao controle.

Figura 17 – A população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não é modulada no baço de animais tratados com *htMSCs* no pico da EAE. Células do baço foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no dia da imunização e no 16^o dia pós-imunização (n= 5 por grupo), foram re-estimuladas *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (1 µg/mL) por 12 h e PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µg/mL) 4h. As células foram submetidas a análise por citometria de fluxo das moléculas de superfície celular (**A e B**) CD4⁺, (**C e D**) CD8⁺ e para as populações específicas de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ (**E, F**) e T CD4⁺IL-17⁺ (**G, H**). Dados representativos de três experimentos independentes. Análise Estatística *Two way ANOVA*, ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,001 em relação ao controle.

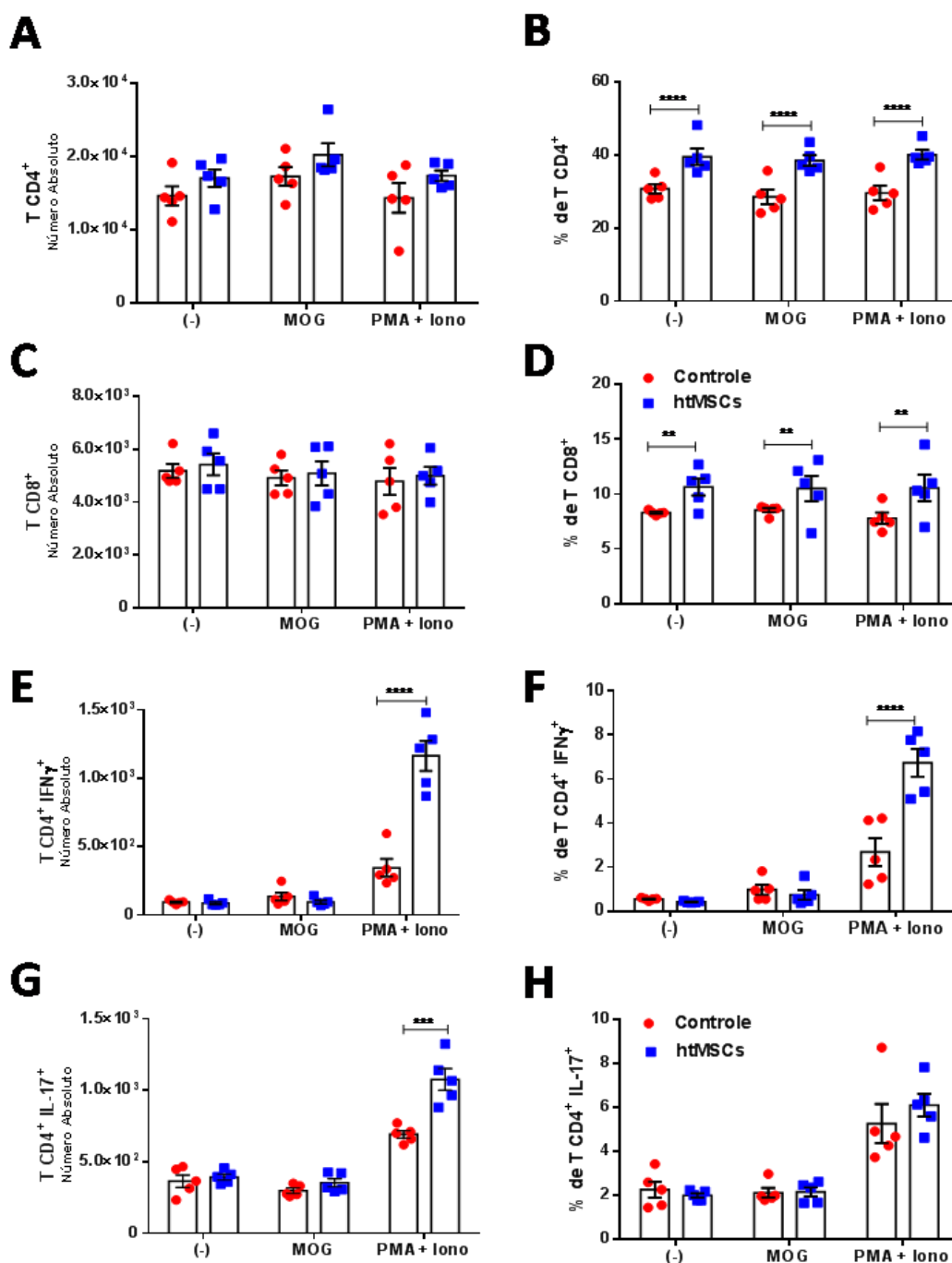
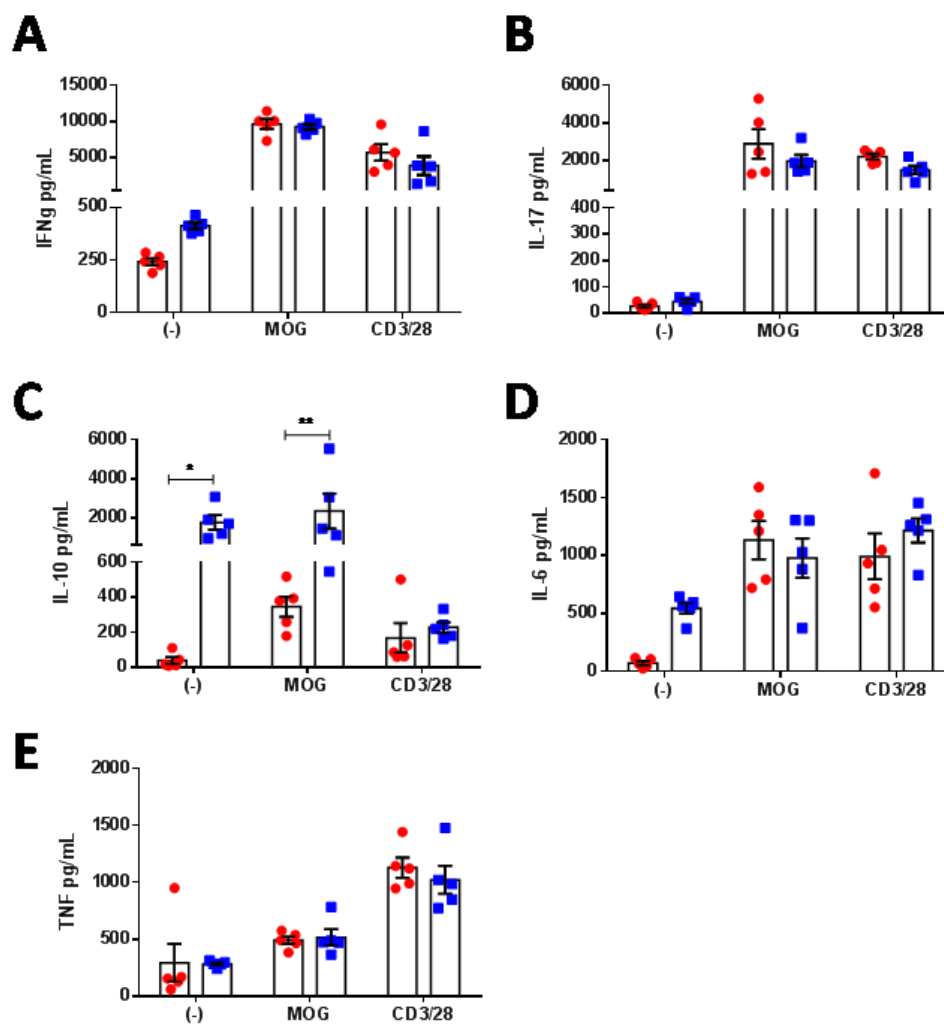


Figura 18 – Perfil de citocinas do baço de animais tratados com *htMSCs* 16 dias pós-imunização e após re-estimulação *in vitro* com MOG. Células do baço foram obtidas de animais com EAE tratados ou não com *htMSCs* no dia da imunização e no 16º dia pós-imunização (n= 5 por grupo), foram obtidos, processados e re-estimulados *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (1 µg/mL) e α-CD3 (1 µg/mL); Após 72 horas o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de *CBA*. Dados representativos de três experimentos independentes. Análise Estatística *Two way ANOVA*, * p<0,05; ** p < 0,01 em relação ao controle.



4.5 Imunomodulação das *htMSCs* no sistema nervoso central durante o pico da EAE

4.5.1 O tratamento com duas doses de *htMSCs* reduz a neuroinflamação impedindo células inflamatórias de se infiltrarem no cérebro e diminuindo a ativação das células da microglia

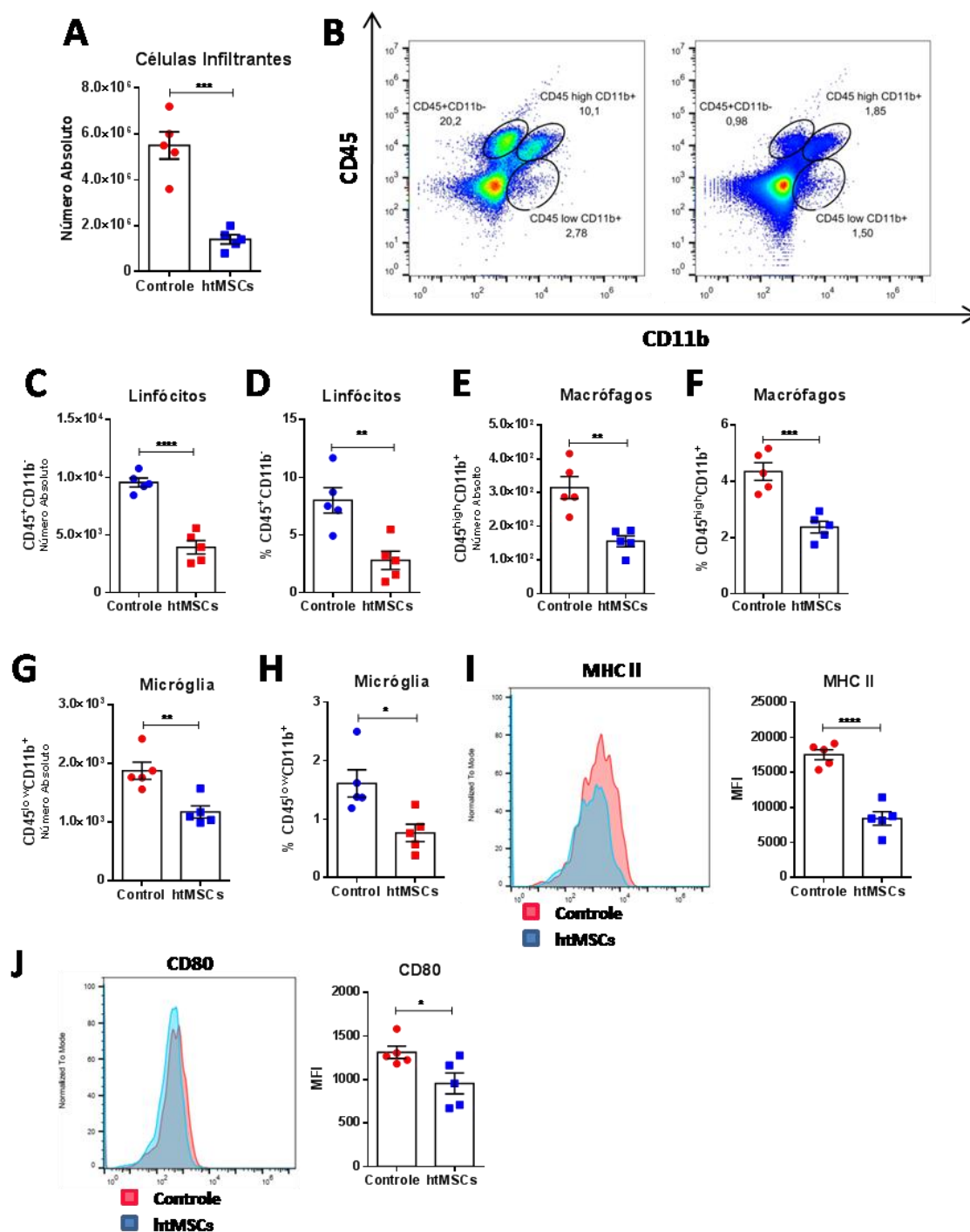
Conforme observado nos resultados anteriores, o tratamento com *htMSCs* reduziu o infiltrado inflamatório e desmielinização na medula espinhal dos animais tratados (Fig. 8 C). Sendo assim, o próximo passo foi analisar as células infiltrantes no sistema nervoso central dos animais, evento que acontece no pico da doença, onde ocorre o início do aparecimento dos sinais clínicos. A figura 19 A mostra que o tratamento com *htMSCs* reduziu significativamente o número total de células infiltrantes no cérebro dos animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Com o objetivo de analisarmos as populações de células presentes no cérebro de animais com EAE no pico da doença, as células mononucleares do SNC foram analisadas por citometria de fluxo em relação às populações de linfócitos infiltrantes ($CD45^+CD11b^-$), macrófagos infiltrantes ($CD45^{high}CD11b^+$) e microglia residente ativada ($CD45^{low}CD11b^+$) (Fig. 19 B). Os resultados mostram que o tratamento com *htMSCs* reduziu a frequência e número absoluto de linfócitos (Fig. 19 C, D), macrófagos infiltrantes (Fig. 19 E, F) e células da microglia ativada (Fig. 19 G, H). Ainda, na população de microglia residente, houve diminuição da expressão das moléculas de MHC II (Fig. 19 I) e CD80 (Fig. 19 J). A partir desses dados concluímos que o tratamento com *htMSCs* ao impedir as células inflamatórias de atingirem o SNC e reduzir a ativação da microglia existente, diminui a neuroinflamação.

4.5.2 O tratamento com *htMSCs* reduz a infiltração de linfócitos patogênicos *Th1* e *Th17* no SNC

Uma vez que observamos a redução da neuroinflamação, analisamos especificamente a população de linfócitos infiltrantes. Para isso, as células

Figura 19 – O tratamento com *htMSCs* reduz o infiltrado celular no SNC de animais com EAE. Células do sistema nervoso central de camundongos com EAE tratados ou não com duas doses de *htMSCs* foram obtidas no 16º dia pós-imunização e analisadas por citometria de fluxo para identificação do (A) número absoluto de células infiltrantes, (B) das populações de linfócitos ($CD45^+CD11b^+$), macrófagos ($CD45^{high}CD11b^+$), microglia ($CD45^{low}CD11b^+$), frequência e número absoluto de linfócitos (C, D), macrófagos (E, F) e microglia (G, H). Expressão das moléculas de (I) MHC II e (J) CD80 dentro da população de microglia. Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística *T test*, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



mononucleares do SNC extraídas no pico da doença foram re-estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ e analisadas em relação a população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Dentro da população de células T CD4⁺, analisamos as subpopulações de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ (T CD4⁺IFN- γ ⁺) e linfócitos Th17 (T CD4⁺IL-17⁺) produtores de IL-17.

O tratamento com *htMSCs* foi amplamente eficaz em reduzir a frequência e número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (Fig. 20 A e B) e T CD8⁺ (Fig. 20 C e D). Mais que isso, reduziu significativamente a expressão, frequência e número absoluto de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ (Fig. 20 E, F e G). Da mesma forma, os animais tratados apresentaram redução na expressão, frequência e número absoluto de células T CD4⁺IL-17⁺ (Fig. 20 H, I e J). Coletivamente, esses demonstram que o tratamento com *htMSCs* reduzem a neuroinflamação impedindo a entrada especificamente de células Th1 e Th17 no SNC de camundongos com EAE.

4.5.3 O tratamento com htMSCs reduz a produção das citocinas IFN- γ e IL-17 no cérebro

A última análise do cérebro dos animais com EAE foi o perfil de citocinas das células mononucleadas do SNC extraídas no pico da doença re-estimuladas ou não MOG₃₅₋₅₅ e α -CD3. De fato, o perfil de citocinas corrobora os achados anteriores, uma vez que houve diminuição da produção de IFN- γ e IL-17 no grupo de animais tratados com *htMSCs* quando comparados ao grupo controle (Fig. 21 A, B). No cérebro também, assim como no baço e linfonodos, durante a fase inicial da EAE, e no baço durante o pico da EAE, a produção de IL-10 é maior no grupo tratado do que no grupo controle (Fig.21 C), sugerindo que as *htMSCs* atuem na indução dessa citocina anti-inflamatória.

Não houve alteração na produção das citocina IL-6 e TNF- α entre o grupo tratado e controle (Fig. 21 D, E). Esses dados sugerem que essas citocinas pró-inflamatórias não são reguladas pelas *htMSCs*, entretanto, não interferem no efeito imunomodulador sobre as células encefalitogênicas e não impede a produção de citocinas anti-inflamatórias no cérebro e na periferia.

Figura 20 – O tratamento com *htMSCs* reduz o infiltrado de células Th1 e Th17 no SNC de animais com EAE. Células do sistema nervoso central de camundongos com EAE tratados ou não com duas doses de *htMSCs* foram obtidas no 16^o dia pós-imunização e analisadas por citometria de fluxo para identificação da frequência e número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (A, B) e T CD8⁺ (C, D); produção das citocinas IFN- γ (E) e IL-17 (H) e frequência e número absoluto das células Th1 (T CD4⁺ IFN- γ ⁺) (F, G) e Th17 (T CD4⁺ IL-17⁺) (I, J). Dados representativos de dois experimentos independentes. Análise Estatística *Two way ANOVA test*, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

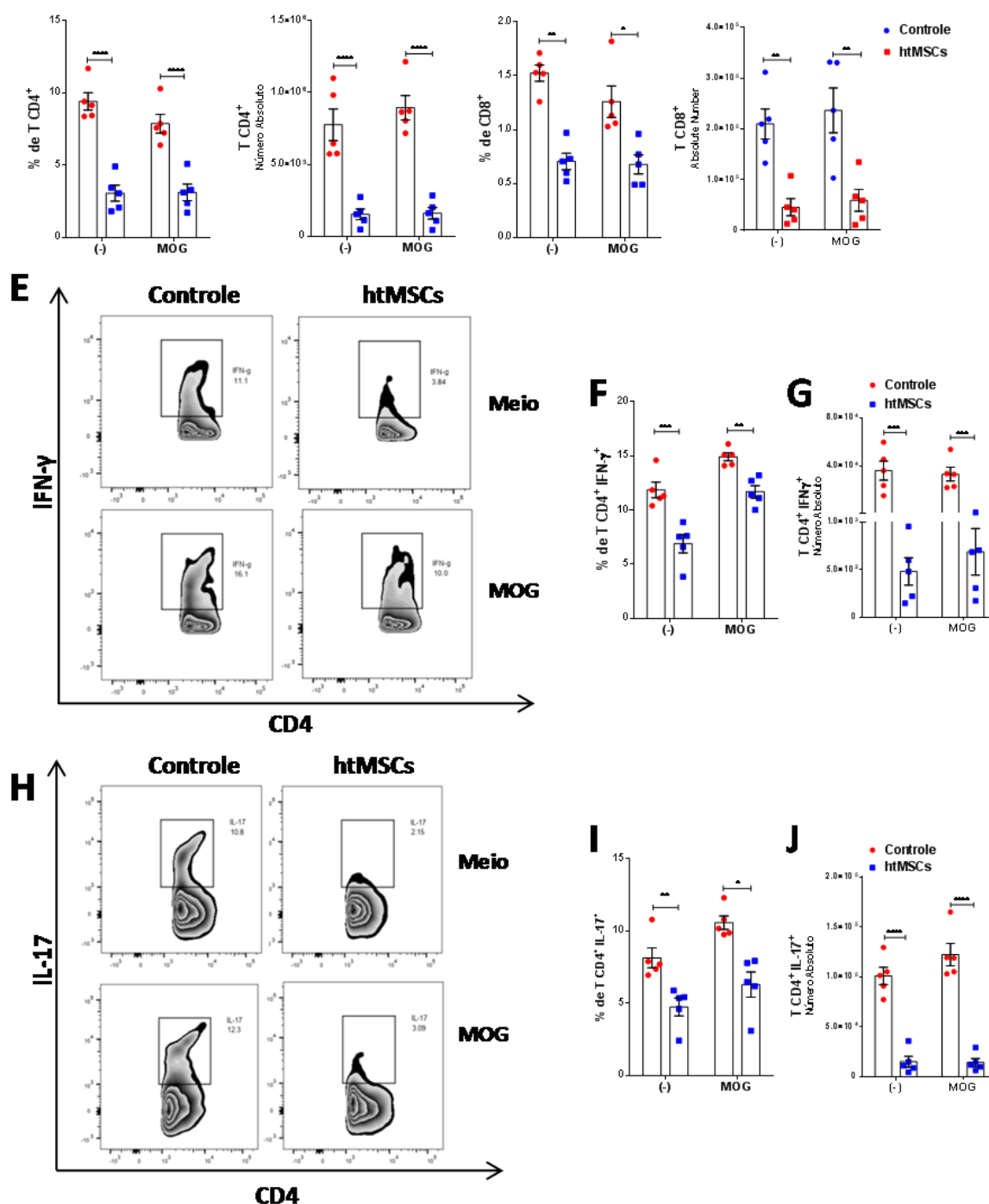
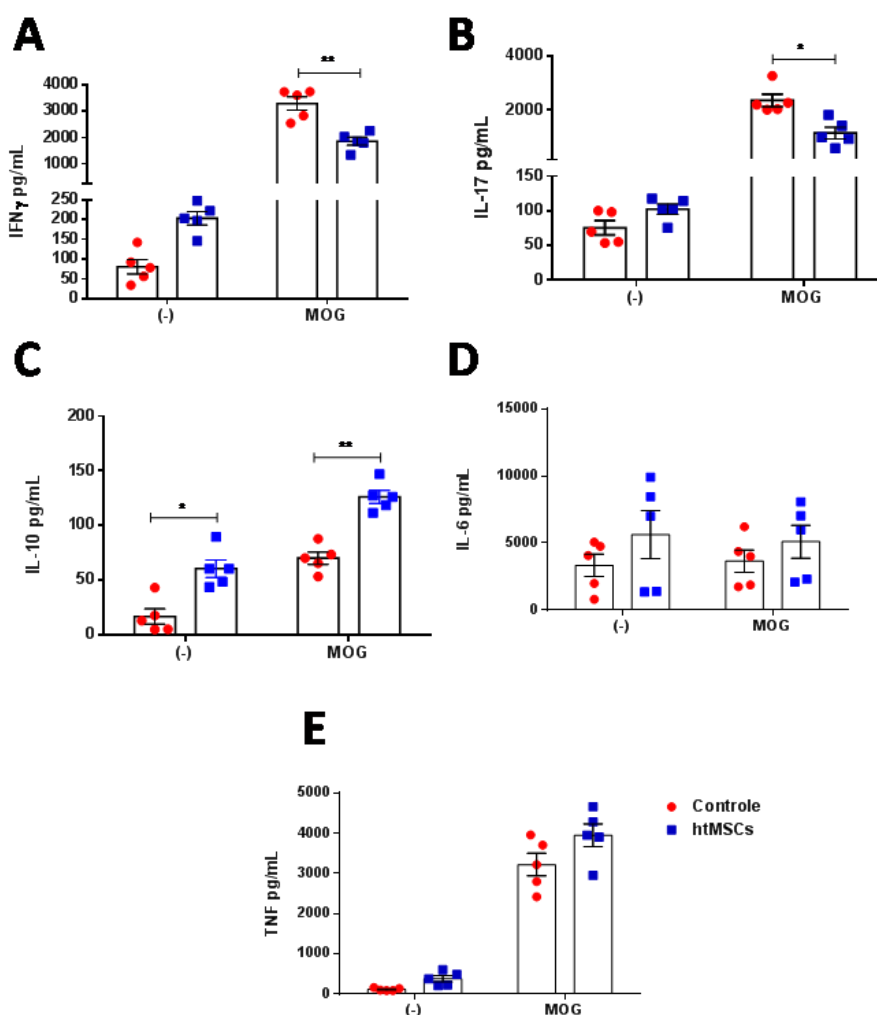


Figura 21 – Perfil de citocinas de células mononucleares do cérebro de animais tratados com *htMSCs* 16 dias pós-imunização e após re-estimulação *in vitro* com MOG. Células do sistema nervoso central de camundongos com EAE tratados ou não com duas doses de *htMSCs* foram obtidas no 16^o dia pós-imunização (n= 5 por grupo) foram obtidas, processadas e re-estimuladas *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (1 µg/mL) e α-CD3 (1 µg/mL); Após 72 horas o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas através da técnica de *CBA*. Dados representativos de três experimentos independentes. Análise Estatística *Two way ANOVA*, * p<0,05; ** p < 0,01 em relação ao controle.

Mononucleares



4.6 Avaliação da medula espinhal no pico da doença em animais com EAE tratados com *htMSCs*

4.6.1 *As htMSCs inibem a transcrição dos genes pró-inflamatórios e induzem a transcrição de genes imunomodulatórios na medula espinhal durante o pico da doença*

Com o objetivo de avaliar o infiltrado inflamatório, agora no pico da doença, as medulas espinhais obtidas no 16^o dia pós-imunização foram submetidas a análise histológica por HE. A figura 22 mostra a redução do infiltrado no grupo tratado em comparação ao controle em cortes transversais (Fig. 22 A) e longitudinais (Fig. 22 B, C).

Verificamos também a capacidade de regulação gênica das *htMSCs* na medula de animais no pico da doença, de forma semelhante a análise feita no 30^o dias pós-imunização. As medulas espinhais dos animais tratados ou não foram analisadas quanto a expressão dos mesmos genes analisados previamente. Observamos que no pico da doença, as *htMSCs* mantêm a capacidade de diminuir a expressão gênica dos genes relacionados às populações de linfócitos T patogênicos Th1 (Fig. 22 D e E) e Th17 (Fig. 22 F) na EAE, respectivamente. Nota-se que o tratamento aumentou a expressão do gene *Bdnf* e *IDO* (Fig. 22 I, K).

Assim, concluímos que a propriedade imunomoduladora das *htMSCs* atua na medula espinhal durante o pico da doença e perdura até o 30^o dia, conferindo proteção aos animais tratados inibindo a progressão da doença.

4.6.2 *As htMSCs diminuem a expressão de receptores de quimiocinas e citocinas quimiotáticas na medula espinhal de camundongos EAE*

Os dados obtidos até o momento demonstram o papel imunomodulador das *htMSCs* no modelo da EAE. A fim de avaliarmos por qual mecanismo as células tronco agem, as medulas espinhais de animais com EAE obtidas no 16^o dia pós-imunização foram analisadas por PCR array. Na figura 23, observamos

que o tratamento com *htMSCs* aumentou a expressão do gene *CCL12* e reduziu a expressão de outros 18 genes, entre eles, o gene da quimiocina *CCL5* e dos receptores quimiotáticos *CCR4*, *CCR8*, *CCR6*. Esses dados sugerem que as *htMSCs* podem agir modulando quimiocinas e seus receptores diminuindo assim a entrada de macrófagos e linfócitos no sistema nervoso dos animais tratados.

Figura 22 – O tratamento com *htMSCs* reduz a neuroinflamação e modula a expressão gênica na medula espinhal. Camundongos C57BL/6 que receberam MOG₃₅₋₅₅ (150µg/animal) emulsificado em CFA (v/v), contendo *M. tuberculosis* H37 (100µg/animal), foram tratados ou não com *htMSCs* (1x10⁶ células/animal) via intra-peritoneal no dia 0 e 16 pós-imunização. No dia 16, após eutanásia, a medula espinhal foi obtida e corada com (C) HE para analisar células infiltrantes. O mRNA total da parte distal da medula espinhal foi obtido e analisado por RT-PCR em relação a expressão dos genes (D) *Ifng*, (E) *Tbx21*, (F) *Il17a*, (G) *Rorc*, (H) *Foxp3*, (I) *Bdnf*, (J) *Il27* e (K) *Ido*. Os dados foram normalizados com o gene da β -actina e comparados ao grupo Controle. Dados representativos de três experimentos independentes. Análise Estatística T test, *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

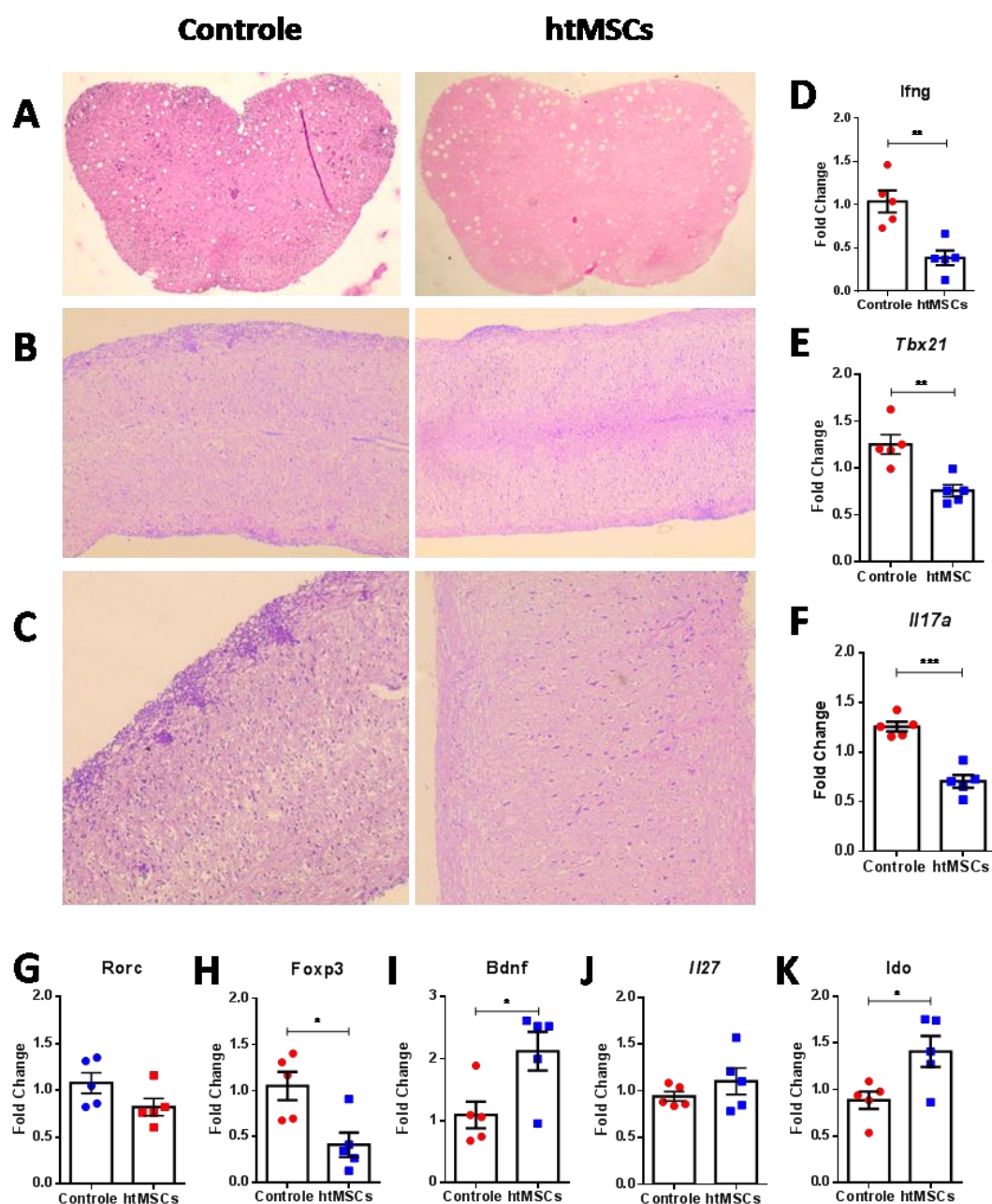
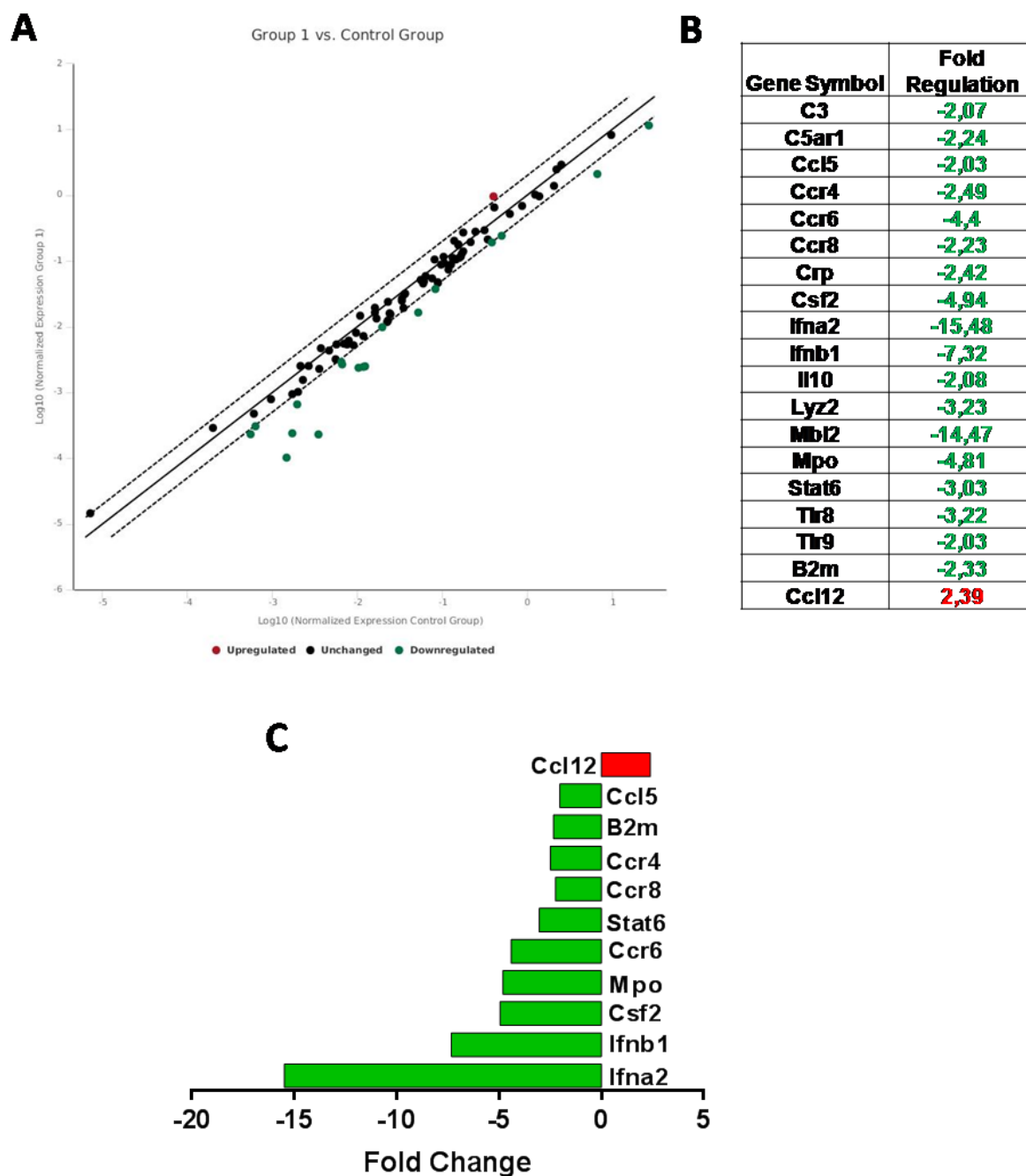


Figura 23 – htMSCs diminuem a expressão de genes de receptores e citocinas quimiotáticas. O mRNA total da parte distal da medula espinhal de animais com EAE tratados ou não com htMSCs nos dias 0 e 16 pós-imunização foi obtido e analisado por PCR array. **(A)** O Gráfico de Dispersão mostra os genes que tiveram sua expressão reduzida em verde e os genes que tiveram maior expressão em relação ao grupo controle em vermelho. **(B)** Quadro dos genes alterados representados no gráfico de dispersão e seus valores de fold change. **(C)** Representação gráfica do quadro de genes.



5 DISCUSSÃO

Células-tronco estromais adultas são tipicamente definidas como células multipotentes não diferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e o potencial de se diferenciar em linhagens celulares distintas (Dominici, Le Blanc et al. 2006), além de constituírem um reservatório nos tecidos conjuntivos na maioria dos órgãos e estarem envolvidas na manutenção e reparo. Apesar de serem funcionalmente heterogêneas, as populações de *hMSCs* isoladas de diferentes tecidos como medula óssea, músculo esquelético, tecido adiposo, polpa dentária, placenta e cordão umbilical (Bobis, Jarocha et al. 2006, Phinney and Prockop 2007, de Mendonca Costa, Bueno et al. 2008, Evangelista, Soncini et al. 2008, Secco, Zucconi et al. 2008, Valtieri and Sorrentino 2008, Warburton, Perin et al. 2008) apresentam um perfil similar de expressão de receptores de superfície.

Em nosso trabalho, utilizamos a célula-tronco estromal derivada de tubas uterinas humanas, a qual apresentou a capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos, e demonstrou possuir expressão das moléculas de superfície CD29, CD44, CD73, CD90 e HLA-ABC, receptores característicos de *hMSCs*. Dessa forma comprovamos que as *htMSCs* são adequadas para o nosso estudo.

Um dos maiores desafios da medicina é encontrar um tratamento seguro e eficaz para doenças relacionadas ao sistema imunológico. No entanto, devido à baixa eficácia do tratamento disponível e à ocorrência de efeitos adversos graves, muitos grupos estão atualmente procurando alternativas à terapia tradicional. Nesse sentido, o uso de *hMSCs* representa uma grande promessa para o tratamento de uma variedade de doenças relacionadas ao sistema imunológico devido às suas propriedades imunomoduladoras potentes, porém, as *hMSCs* não são supressoras por natureza e essa resposta às células imunológicas depende dos sinais inflamatórios do microambiente (Ren, Zhang et al. 2008, Ren, Zhao et al. 2010).

Nossos dados são corroborados *in vivo* por *hMSCs* de origens distintas no tratamento da EAE. *hMSCs* derivadas da geléia de Wharton foram utilizadas como tratamento em duas doses nos dias 3 e 11 pós-imunização (Torkaman, Ghollasi et al. 2017). *hMSCs* derivadas de tecido adiposo inoculadas apenas uma dose no início da doença antes do surgimento dos sintomas (Anderson, Gonzalez-Rey et al. 2017). Assim como as *htMSCs*, essas estratégias preventivas foram efetivas para diminuir a progressão da doença nos animais tratados com *htMSCs*.

Por outro lado, trabalhos com *hMSCs* derivadas de medula óssea, polpa dentária e tecido adiposo, foram efetivos mediante o tratamento nos dias 13, 14 e 15 pós imunização, respectivamente (Hou, Ryu et al. 2013, Shalaby, Sabbah et al. 2016, Shimojima, Takeuchi et al. 2016). De forma contraditória, o tratamento aqui demonstrado não foi eficaz quando realizado no dia 10. Dessa forma, concluímos que o as *htMSCs* não são boa candidatas a uma estratégia terapêutica. Todavia, vale mencionar que estudamos um modelo experimental, a EAE, no qual o estímulo com CFA é bastante robusto e, talvez, muito mais intenso do que o observado em pacientes com EM.

Na busca do mecanismo responsável por conferir a inibição da progressão da doença, encontramos dados interessantes na medula espinhal dos animais tratados com *htMSCs*. Em ambas as estratégias de tratamento, dose única ou com a segunda dose 10 dias pós-imunização, ao longo de 30 dias pós imunização e no pico da doença, a expressão de genes relacionados com os linfócitos de perfis Th1 e Th17 estavam diminuídos, porém, o que nos chamou a atenção, foi o fato da expressão dos genes *Bdnf*, *Ido* estarem aumentadas nos animais tratados com *htMSCs*.

O BDNF é um fator neurotrófico envolvido no desenvolvimento e função das células nervosas. Pacientes com EM quando comparado com indivíduos saudáveis, apresentam os níveis de BDNF diminuídos, sugerindo não só a presença de neuro-degeneração como possivelmente baixa capacidade de reparação. Após um surto, no entanto, o BDNF se encontra aumentado no soro, em relação aos níveis basais, provavelmente pelo fato de as células

inflamatórias infiltrantes, macrófagos e linfócitos produzirem BDNF após a inflamação aguda no SNC (Frota, Rodrigues et al. 2009).

Tafreshi *et al.* relataram que fatores neurotróficos como BDNF também são expressos constitutivamente por *hMSCs* derivadas de tecido adiposo, evidenciando o potencial desse tipo de célula-tronco para suporte parácrino em um cenário neurodegenerativo (Tafreshi, Payne et al. 2014). Nossos dados sugerem que as *htMSCs*, de alguma forma, colaboram para o aumento da expressão do gene BDNF, auxiliando na reparação dos danos causados pela EAE.

Outro mecanismo de ação das *hMSCs* descrito na literatura é a expressão intracelular de IDO. Sabe-se que, quando exposta a altos níveis de IFN- γ , *hMSCs* produzem IDO, enzima que depleta o triptofano, aminoácido essencial para a proliferação de linfócitos (Krampera, Cosmi et al. 2006). Trabalhos com *hMSCs* nos modelos da EAE (Donders, Bogie et al. 2018), artrite reumatóide (Luz-Crawford, Torres et al. 2016) e colite ulcerativa relatam esse fenômeno (Duijvestein, Wildenberg et al. 2011). Donders *et al.* demonstrou que após estimular *hMSCs* derivadas da geléia de wharton com IFN- γ , havia aumento na expressão de IDO e diminuição da proliferação de linfócitos T na cocultura de células de Wharton e células mononucleadas de sangue periférico em placas *transwell*[®]. A inibição de IDO usando o 1-metil-L-triptofano neutralizou a capacidade das células de Wharton de suprimir a proliferação dos linfócitos, comprovando assim o efeito parácrino da IDO nos linfócitos T. Dessa forma, apesar de observarmos um aumento da IDO na medula de animais tratados com *htMSCs*, sua verdadeira contribuição na supressão da EAE precisa ser mais estudada.

A EAE é caracterizada pela intensa inflamação no SNC, astriogliose, morte neuronal e desmielinização (Rodriguez 2007), resultantes da ativação de linfócitos T CD4 e T CD8 na periferia, sendo as subclasses Th1, produtoras de IFN- γ , e Th17, produtoras de IL-17, as mais importantes. As células do sistema nervoso, microglia e astrócitos, expressam em sua superfície receptores para ambas as citocinas (Das Sarma, Ciric et al. 2009) e, quando ativadas, secretam

citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-23 e IL-17 (Kawanokuchi, Shimizu et al. 2008) levando ao aumento da inflamação e maior recrutamento de monócitos e linfócitos para o SNC.

Em nosso trabalho, os animais tratados com *htMSCs* apresentaram uma redução significativa do infiltrado inflamatório no cérebro. Esse efeito foi observado tanto no pico da doença como nas análises histopatológicas realizadas 30 dias pós-imunização. Dessa forma, podemos inferir que a severidade da doença está relacionada diretamente ao infiltrado celular no cérebro, conforme descrito na literatura (Peron, Yang et al. 2010). Quando comparamos os infiltrados dos animais tratados em relação ao grupo controle, observamos que o número absoluto dos linfócitos Th1 e Th17, linfócitos responsáveis pela patogenia da EAE, estavam reduzidos, corroborando assim, com o fato dessas populações serem cruciais no estabelecimento da doença (Dardalhon, Korn et al. 2008).

Uma vez que a ativação desses linfócitos ocorre na periferia e, posteriormente migram para o cérebro, hipotetizamos que, um dos mecanismos de supressão das *htMSCs*, é diminuir a ativação dos mesmos. Na periferia, pudemos observar a diminuição da expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, e também da molécula de superfície MHC II em células dendríticas nos linfonodos drenantes dos animais tratados com *htMSCs*. A modulação dessas moléculas por *hMSCs* é conhecida na literatura, e mostra que *hMSCs* derivadas de medula óssea podem afetar a diferenciação e a maturação de monócitos em células dendríticas exatamente por reduzir a expressão das moléculas CD80, CD86 e MHC II citadas acima (Jiang, Zhang et al. 2005)

Outras fontes de *hMSCs* utilizadas no tratamento da EAE obtiveram resultados semelhantes aos resultados apresentados nesse trabalho, como as *hMSCs* derivadas de medula óssea, cordão umbilical e placenta. Nesses estudos também foram observados redução do infiltrado inflamatório do SNC e medula espinhal (Hou, Ryu et al. 2013, Bravo, Gallego et al. 2016), diminuição da população Th1 e Th17 no SNC de camundongos tratados (Bai, Lennon et al.

2009, Wang, Lazorchak et al. 2016), aumento da secreção de da citocina anti-inflamatório IL-10 (Hou, Ryu et al. 2013, Payne, Sun et al. 2013).

Juntos, esses resultados indicam que a melhora na condição clínica observada após a administração de *hMSCs* é uma consequência da inibição na proliferação e infiltração de células inflamatórias, como, Th1 e Th17 e monócitos no sistema nervoso central e medula espinhal promovida por essas células tronco. Pode-se hipotetizar que fatores secretados pelos *hMSCs* administrados, como IL-10, por exemplo, inibem a ativação de células T CD4⁺ auto-rreativas e sua diferenciação em células Th1 tanto na periferia quanto no sistema nervoso central e, talvez, estimulando a diferenciação dessas células T CD4⁺ em linfócitos Treg.

Nossa análise de expressão gênica revelou a diminuição de expressão de receptores de citocinas quimiotáticas CCR4, CCR6 e CCR8. O receptor CCR4 é ligante da quimiocina CCL2, a qual sabidamente está envolvida nos processos neuroinflamatórios do SNC (Gerard and Rollins 2001). De fato, a secreção de CCL2 nas células da glia é aumentada na epilepsia (Fabene, Bramanti et al. 2010), na EM e no modelo da EAE (Ransohoff, Hamilton et al. 1993).

Em suma, nosso trabalho demonstrou que as *htMSCs* possuem de fato um efeito supressor, uma vez que reduzem a resposta inata e adaptativa resultando na redução no desenvolvimento da EAE. Células dendríticas tem sua capacidade de ativação reduzida na periferia, levando a diminuição da polarização de linfócitos T CD4⁺ para os perfis Th1 e Th17. Dessa forma, há diminuição do infiltrado inflamatório no cérebro, de linfócitos Th1, Th17 e, conseqüentemente, menor secreção de IFN- γ e IL-17, e maior secreção de IL-10. A microglia residente, por sua vez, encontra-se menos ativada e, na presença de BDNF e IDO, os linfócitos Th1 e Th17 autorreativos vindos da periferia tem sua ativação reduzida, impedindo o aumento da inflamação no SNC. A esse fato, relacionamos também a expressão reduzidas de receptores de quimiocinas CCR4, CCR8 e CCR6 na medula espinhal. Dessa forma, demonstramos o poder imunodulador e neuroprotetor das *htMSCs* no modelo

da EAE, colaborando na descrição de uma nova fonte para o desenvolvimento de terapias futuras.

6 CONCLUSÕES

- As *htMSCs* suprimem o estabelecimento dos sintomas e a progressão da doença em animais com EAE;
- *htMSCs* modulam a transcrição gênica na medula espinhal inibindo a transcrição de genes relacionados aos perfis Th1 e Th17 e aumentando a expressão de genes imunomoduladores;
- O tratamento com *htMSCs* diminui a expressão de moléculas coestimuladoras e expressão de MHC II em células dendríticas na periferia;
- As *htMSCs* impedem células inflamatórias de adentrar o SNC de animais com EAE, especificamente, os linfócitos patogênicos da doença de perfis Th1 e Th17, respectivamente;
- A microglia residente apresenta um perfil pouco ativado em animais tratados com *htMSCs*;
- As *htMSCs* induzem o aumento de citocinas antiinflamatórias como IL-10, a enzimaIDO e o fator neurotrófico BDNF;

7 REFERÊNCIAS

- Anderson, P., E. Gonzalez-Rey, F. O'Valle, F. Martin, F. J. Oliver and M. Delgado (2017). "Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Self-Reactive T Cell Responses and Dendritic Cell Function." *Stem Cells Int* **2017**: 2389753.
- Bai, L., D. P. Lennon, V. Eaton, K. Maier, A. I. Caplan, S. D. Miller and R. H. Miller (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis." *Glia* **57**(11): 1192-1203.
- Bailey, S. L., B. Schreiner, E. J. McMahon and S. D. Miller (2007). "CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE." *Nat Immunol* **8**(2): 172-180.
- Barkhof, F., P. Scheltens, S. T. Frequin, J. J. Nauta, M. W. Tas, J. Valk and O. R. Hommes (1992). "Relapsing-remitting multiple sclerosis: sequential enhanced MR imaging vs clinical findings in determining disease activity." *AJR Am J Roentgenol* **159**(5): 1041-1047.
- Beyth, S., Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun and J. Rachmilewitz (2005). "Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness." *Blood* **105**(5): 2214-2219.
- Bobis, S., D. Jarocha and M. Majka (2006). "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." *Folia Histochem Cytobiol* **44**(4): 215-230.
- Bravo, B., M. I. Gallego, A. I. Flores, R. Bornstein, A. Puente-Bedia, J. Hernandez, P. de la Torre, E. Garcia-Zaragoza, R. Perez-Tavarez, J. Grande, A. Ballester and S. Ballester (2016). "Restrained Th17 response and myeloid cell infiltration into the central nervous system by human decidua-derived mesenchymal stem cells during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Stem Cell Res Ther* **7**: 43.
- Bronner, G., E. Elran, J. Golomb and A. D. Korczyn (2010). "Female sexuality in multiple sclerosis: the multidimensional nature of the problem and the intervention." *Acta Neurol Scand* **121**(5): 289-301.
- Charcot, M. (1881). "Demonstration of Arthropathic Affections of Locomotor Ataxy." *Br Med J* **2**(1076): 285.
- Chen, M., G. Chen, S. Deng, X. Liu, G. J. Hutton and J. Hong (2012). "IFN-beta induces the proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **242**(1-2): 39-46.
- Dardalhon, V., T. Korn, V. K. Kuchroo and A. C. Anderson (2008). "Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity." *J Autoimmun* **31**(3): 252-256.
- Das Sarma, J., B. Ciric, R. Marek, S. Sadhukhan, M. L. Caruso, J. Shafagh, D. C. Fitzgerald, K. S. Shindler and A. Rostami (2009). "Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroinflammation* **6**: 14.
- de Girolamo, L., E. Lucarelli, G. Alessandri, M. A. Avanzini, M. E. Bernardo, E. Biagi, A. T. Brini, G. D'Amico, F. Fagioli, I. Ferrero, F. Locatelli, R. Maccario, M. Marazzi, O. Parolini, A. Pessina, M. L. Torre and G. Italian Mesenchymal Stem Cell (2013). "Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy." *Curr Pharm Des* **19**(13): 2459-2473.
- de Mendonca Costa, A., D. F. Bueno, M. T. Martins, I. Kerkis, A. Kerkis, R. D. Fanganiello, H. Cerruti, N. Alonso and M. R. Passos-Bueno (2008). "Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells." *J Craniofac Surg* **19**(1): 204-210.

DelaRosa, O., E. Lombardo, A. Beraza, P. Mancheno-Corvo, C. Ramirez, R. Menta, L. Rico, E. Camarillo, L. Garcia, J. L. Abad, C. Trigueros, M. Delgado and D. Buscher (2009). "Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells." Tissue Eng Part A **15**(10): 2795-2806.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.

Donders, R., J. F. J. Bogie, S. Ravanidis, P. Gervois, M. Vanheusden, R. Maree, M. Schrynemackers, H. J. M. Smeets, J. Pinxteren, K. Gijbels, S. Walbers, R. W. Mays, R. Deans, L. Van Den Bosch, P. Stinissen, I. Lambrichts, W. Gyselaers and N. Hellings (2018). "Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells." Stem Cells Dev **27**(2): 65-84.

Donders, R., M. Vanheusden, J. F. Bogie, S. Ravanidis, K. Thewissen, P. Stinissen, W. Gyselaers, J. J. Hendriks and N. Hellings (2015). "Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display Immunomodulatory Properties and Transiently Improve Rat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." Cell Transplant **24**(10): 2077-2098.

Duijvestein, M., M. E. Wildenberg, M. M. Welling, S. Hennink, I. Molendijk, V. L. van Zuylen, T. Bosse, A. C. Vos, E. S. de Jonge-Muller, H. Roelofs, L. van der Weerd, H. W. Verspaget, W. E. Fibbe, A. A. te Velde, G. R. van den Brink and D. W. Hommes (2011). "Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis." Stem Cells **29**(10): 1549-1558.

Evangelista, M., M. Soncini and O. Parolini (2008). "Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy?" Cytotechnology **58**(1): 33-42.

Fabene, P. F., P. Bramanti and G. Constantin (2010). "The emerging role for chemokines in epilepsy." J Neuroimmunol **224**(1-2): 22-27.

Filippi, M., M. A. Rocca, G. Martino, M. A. Horsfield and G. Comi (1998). "Magnetization transfer changes in the normal appearing white matter precede the appearance of enhancing lesions in patients with multiple sclerosis." Ann Neurol **43**(6): 809-814.

Finkelsztejn, A., J. S. Lopes, J. Noal and J. M. Finkelsztejn (2014). "The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil." Arq Neuropsiquiatr **72**(2): 104-106.

Freedman, M. S. (2013). "Teriflunomide in relapsing multiple sclerosis: therapeutic utility." Ther Adv Chronic Dis **4**(5): 192-205.

Friese, M. A., X. Montalban, N. Willcox, J. I. Bell, R. Martin and L. Fugger (2006). "The value of animal models for drug development in multiple sclerosis." Brain **129**(Pt 8): 1940-1952.

Frota, E. R., D. H. Rodrigues, E. A. Donadi, D. G. Brum, D. R. Maciel and A. L. Teixeira (2009). "Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse." Neurosci Lett **460**(2): 130-132.

Fuenzalida, P., M. Kurte, C. Fernandez-O'ryan, C. Ibanez, M. Gauthier-Abeliuk, A. M. Vega-Letter, P. Gonzalez, C. Irrarrazabal, N. Quezada, F. Figueroa and F. Carrion (2016). "Toll-like receptor 3 preconditioning increases the therapeutic efficacy of umbilical cord mesenchymal stromal cells in a dextran sulfate sodium-induced colitis model." Cytotherapy **18**(5): 630-641.

Gargett, C. E. (2007). "Uterine stem cells: what is the evidence?" Hum Reprod Update **13**(1): 87-101.

Gerard, C. and B. J. Rollins (2001). "Chemokines and disease." Nat Immunol **2**(2): 108-115.

- Giacoppo, S., S. R. Thangavelu, F. Diomede, P. Bramanti, P. Conti, O. Trubiani and E. Mazzon (2017). "Anti-inflammatory effects of hypoxia-preconditioned human periodontal ligament cell secretome in an experimental model of multiple sclerosis: a key role of IL-37." *FASEB J* **31**(12): 5592-5608.
- Gold, R., L. Kappos, D. L. Arnold, A. Bar-Or, G. Giovannoni, K. Selmaj, C. Tornatore, M. T. Sweetser, M. Yang, S. I. Sheikh, K. T. Dawson and D. S. Investigators (2012). "Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **367**(12): 1098-1107.
- Goverman, J., A. Perchellet and E. S. Huseby (2005). "The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**(2): 239-245.
- Grzesiuk, A. K. (2006). "[Clinical and epidemiologic characteristics of 20 patients with multiple sclerosis in Cuiaba-Mato Grosso, Brazil]." *Arq Neuropsiquiatr* **64**(3A): 635-638.
- Han, X., Q. Yang, L. Lin, C. Xu, C. Zheng, X. Chen, Y. Han, M. Li, W. Cao, K. Cao, Q. Chen, G. Xu, Y. Zhang, J. Zhang, R. J. Schneider, Y. Qian, Y. Wang, G. Brewer and Y. Shi (2014). "Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells." *Cell Death Differ* **21**(11): 1758-1768.
- Hauser, S. L. and J. R. Oksenberg (2006). "The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration." *Neuron* **52**(1): 61-76.
- Havla, J., L. A. Gerdes, I. Meinl, M. Krumbholz, H. Faber, F. Weber, H. L. Pellkofer, R. Hohlfeld and T. Kumpfel (2011). "De-escalation from natalizumab in multiple sclerosis: recurrence of disease activity despite switching to glatiramer acetate." *J Neurol* **258**(9): 1665-1669.
- Hirota, K., J. H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D. J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A. J. Potocnik and B. Stockinger (2011). "Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses." *Nat Immunol* **12**(3): 255-263.
- Hou, Y., C. H. Ryu, K. Y. Park, S. M. Kim, C. H. Jeong and S. S. Jeun (2013). "Effective combination of human bone marrow mesenchymal stem cells and minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis mice." *Stem Cell Res Ther* **4**(4): 77.
- Ireland, S. and N. Monson (2011). "Potential impact of B cells on T cell function in multiple sclerosis." *Mult Scler Int* **2011**: 423971.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Jacobs, L. D., R. W. Beck, J. H. Simon, R. P. Kinkel, C. M. Brownschidle, T. J. Murray, N. A. Simonian, P. J. Slasor and A. W. Sandrock (2000). "Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group." *N Engl J Med* **343**(13): 898-904.
- Jacobs, L. D., D. L. Cookfair, R. A. Rudick, R. M. Herndon, J. R. Richert, A. M. Salazar, J. S. Fischer, D. E. Goodkin, C. V. Granger, J. H. Simon, J. J. Alam, D. M. Bartoszak, D. N. Bourdette, J. Braiman, C. M. Brownschidle, M. E. Coats, S. L. Cohan, D. S. Dougherty, R. P. Kinkel, M. K. Mass, F. E. Munschauer, 3rd, R. L. Priore, P. M. Pulicino, B. J. Scherokman, R. H. Whitham and et al. (1996). "Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG)." *Ann Neurol* **39**(3): 285-294.
- Jazedje, T., P. M. Perin, C. E. Czeresnia, M. Maluf, S. Halpern, M. Secco, D. F. Bueno, N. M. Vieira, E. Zucconi and M. Zatz (2009). "Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures." *J Transl Med* **7**: 46.
- Jiang, X. X., Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu and N. Mao (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **105**(10): 4120-4126.

- Kabat, E. A., A. Wolf and A. E. Bezer (1947). "The Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Heterologous and Homologous Brain Tissue with Adjuvants." J Exp Med **85**(1): 117-130.
- Kang, Z., C. Z. Altuntas, M. F. Gulen, C. Liu, N. Giltiy, H. Qin, L. Liu, W. Qian, R. M. Ransohoff, C. Bergmann, S. Stohlman, V. K. Tuohy and X. Li (2010). "Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis." Immunity **32**(3): 414-425.
- Kawanokuchi, J., K. Shimizu, A. Nitta, K. Yamada, T. Mizuno, H. Takeuchi and A. Suzumura (2008). "Production and functions of IL-17 in microglia." J Neuroimmunol **194**(1-2): 54-61.
- Kim, K. W., S. J. Moon, M. J. Park, B. M. Kim, E. K. Kim, S. H. Lee, E. J. Lee, B. H. Chung, C. W. Yang and M. L. Cho (2015). "Optimization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease." Stem Cell Res Ther **6**: 202.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo and Y. Iwakura (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(1): 566-573.
- Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarlasci, B. Mazzinghi, G. Pizzolo, F. Vinante, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2006). "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(2): 386-398.
- Kreymborg, K., R. Etzensperger, L. Dumoutier, S. Haak, A. Rebollo, T. Buch, F. L. Heppner, J. C. Renauld and B. Becher (2007). "IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **179**(12): 8098-8104.
- Krumbholz, M., T. Derfuss, R. Hohlfeld and E. Meinl (2012). "B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy." Nat Rev Neurol **8**(11): 613-623.
- Le Blanc, K. and D. Mougiakakos (2012). "Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system." Nat Rev Immunol **12**(5): 383-396.
- Lee, H. J., J. H. Ko, H. J. Jeong, A. Y. Ko, M. K. Kim, W. R. Wee, S. O. Yoon and J. Y. Oh (2015). "Mesenchymal stem/stromal cells protect against autoimmunity via CCL2-dependent recruitment of myeloid-derived suppressor cells." J Immunol **194**(8): 3634-3645.
- Lee, R. H., A. A. Pulin, M. J. Seo, D. J. Kota, J. Ylostalo, B. L. Larson, L. Semprun-Prieto, P. Delafontaine and D. J. Prockop (2009). "Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6." Cell Stem Cell **5**(1): 54-63.
- Liao, W., V. Pham, L. Liu, M. Riazifar, E. J. Pone, S. X. Zhang, F. Ma, M. Lu, C. M. Walsh and W. Zhao (2016). "Mesenchymal stem cells engineered to express selectin ligands and IL-10 exert enhanced therapeutic efficacy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis." Biomaterials **77**: 87-97.
- Link, J., R. Ramanujam, M. Auer, M. Ryner, S. Hassler, D. Bachelet, C. Mbogning, C. Warnke, D. Buck, P. E. Hyltdgaard Jensen, C. Sievers, K. Ingenhoven, N. Fissolo, R. Lindberg, V. Grummel, N. Donnellan, M. Comabella, X. Montalban, B. Kieseier, P. Soelberg Sorensen, H. P. Hartung, T. Derfuss, A. Lawton, D. Sikkema, M. Pallardy, B. Hemmer, F. Deisenhammer, P. Broet, P. Donnes, J. Davidson, A. Fogdell-Hahn and A. Consortium (2017). "Clinical practice of analysis of anti-drug antibodies against interferon beta and natalizumab in multiple sclerosis patients in Europe: A descriptive study of test results." PLoS One **12**(2): e0170395.

Liu, R., Z. Zhang, Z. Lu, C. Borlongan, J. Pan, J. Chen, L. Qian, Z. Liu, L. Zhu, J. Zhang and Y. Xu (2013). "Human umbilical cord stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating immunoinflammation and remyelination." Stem Cells Dev **22**(7): 1053-1062.

Locatelli, F., R. Maccario and F. Frassoni (2007). "Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?" Haematologica **92**(7): 872-877.

Luz-Crawford, P., M. J. Torres, D. Noel, A. Fernandez, K. Toupet, F. Alcayaga-Miranda, G. Tejedor, C. Jorgensen, S. E. Illanes, F. E. Figueroa, F. Djouad and M. Khoury (2016). "The immunosuppressive signature of menstrual blood mesenchymal stem cells entails opposite effects on experimental arthritis and graft versus host diseases." Stem Cells **34**(2): 456-469.

Lyons, R. A., E. Saridogan and O. Djahanbakhch (2006). "The reproductive significance of human Fallopian tube cilia." Hum Reprod Update **12**(4): 363-372.

Miller, S. D., C. L. Vanderlugt, W. S. Begolka, W. Pao, R. L. Yauch, K. L. Neville, Y. Katz-Levy, A. Carrizosa and B. S. Kim (1997). "Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading." Nat Med **3**(10): 1133-1136.

Moreno Torres, I. and A. Garcia-Merino (2017). "Anti-CD20 monoclonal antibodies in multiple sclerosis." Expert Rev Neurother **17**(4): 359-371.

Nemeth, K., A. Keane-Myers, J. M. Brown, D. D. Metcalfe, J. D. Gorham, V. G. Bundoc, M. G. Hodges, I. Jelinek, S. Madala, S. Karpati and E. Mezey (2010). "Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5652-5657.

Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, P. S. Yuen, B. Mayer, A. Parmelee, K. Doi, P. G. Robey, K. Leelahavanichkul, B. H. Koller, J. M. Brown, X. Hu, I. Jelinek, R. A. Star and E. Mezey (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production." Nat Med **15**(1): 42-49.

O'Connor, R. A., C. T. Prendergast, C. A. Sabatos, C. W. Lau, M. D. Leech, D. C. Wraith and S. M. Anderton (2008). "Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **181**(6): 3750-3754.

Olah, M., S. Amor, N. Brouwer, J. Vinet, B. Eggen, K. Biber and H. W. Boddeke (2012). "Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination." Glia **60**(2): 306-321.

Ortiz, L. A., M. Dutreil, C. Fattman, A. C. Pandey, G. Torres, K. Go and D. G. Phinney (2007). "Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 11002-11007.

Park, M. J., S. K. Kwok, S. H. Lee, E. K. Kim, S. H. Park and M. L. Cho (2015). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus." Cell Transplant **24**(11): 2367-2377.

Payne, N. L., G. Sun, C. McDonald, D. Layton, L. Moussa, A. Emerson-Webber, N. Veron, C. Siatskas, D. Herszfeld, J. Price and C. C. Bernard (2013). "Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination." Cell Transplant **22**(8): 1409-1425.

Peron, J. P., T. Jazedje, W. N. Brandao, P. M. Perin, M. Maluf, L. P. Evangelista, S. Halpern, M. G. Nisenbaum, C. E. Czeresnia, M. Zatz, N. O. Camara and L. V. Rizzo (2012). "Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice." Stem Cell Rev **8**(3): 940-952.

Peron, J. P., K. Yang, M. L. Chen, W. N. Brandao, A. S. Basso, A. G. Commodaro, H. L. Weiner and L. V. Rizzo (2010). "Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice." J Neuroimmunol **227**(1-2): 10-17.

Pettinelli, C. B. and D. E. McFarlin (1981). "Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes." J Immunol **127**(4): 1420-1423.

Phinney, D. G. and D. J. Prockop (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." Stem Cells **25**(11): 2896-2902.

Pilote, S., C. Simard and B. Drolet (2017). "Fingolimod (Gilenya(R)) in multiple sclerosis: bradycardia, atrioventricular blocks, and mild effect on the QTc interval. Something to do with the L-type calcium channel?" Fundam Clin Pharmacol.

Ponomarev, E. D., L. P. Shriver, K. Maresz and B. N. Dittel (2005). "Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity." J Neurosci Res **81**(3): 374-389.

Prajeeth, C. K., O. Dittrich-Breiholz, S. R. Talbot, P. A. Robert, J. Huehn and M. Stangel (2018). "IFN-gamma Producing Th1 Cells Induce Different Transcriptional Profiles in Microglia and Astrocytes." Front Cell Neurosci **12**: 352.

Rafei, M., P. M. Campeau, A. Aguilar-Mahecha, M. Buchanan, P. Williams, E. Birman, S. Yuan, Y. K. Young, M. N. Boivin, K. Forner, M. Basik and J. Galipeau (2009). "Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner." J Immunol **182**(10): 5994-6002.

Ransohoff, R. M., T. A. Hamilton, M. Tani, M. H. Stoler, H. E. Shick, J. A. Major, M. L. Estes, D. M. Thomas and V. K. Tuohy (1993). "Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis." FASEB J **7**(6): 592-600.

Ren, G., L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A. I. Roberts, R. C. Zhao and Y. Shi (2008). "Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide." Cell Stem Cell **2**(2): 141-150.

Ren, G., X. Zhao, L. Zhang, J. Zhang, A. L'Huillier, W. Ling, A. I. Roberts, A. D. Le, S. Shi, C. Shao and Y. Shi (2010). "Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression." J Immunol **184**(5): 2321-2328.

Rodriguez, M. (2007). "Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis." Brain Pathol **17**(2): 219-229.

Rothhammer, V., S. Heink, F. Petermann, R. Srivastava, M. C. Claussen, B. Hemmer and T. Korn (2011). "Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE." J Exp Med **208**(12): 2465-2476.

Ruck, T., A. M. Afzali, K. F. Lukat, M. Eveslage, C. C. Gross, S. Pfeuffer, S. Bittner, L. Klotz, N. Melzer, H. Wiendl and S. G. Meuth (2016). "ALAIN01--Alemtuzumab in autoimmune inflammatory neurodegeneration: mechanisms of action and neuroprotective potential." BMC Neurol **16**: 34.

Sanchez-de la Rosa, R., E. Sabater, M. A. Casado and R. Arroyo (2012). "Cost-effectiveness analysis of disease modifying drugs (interferons and glatiramer acetate) as first line treatments in remitting-relapsing multiple sclerosis patients." J Med Econ **15**(3): 424-433.

Secco, M., E. Zucconi, N. M. Vieira, L. L. Fogaca, A. Cerqueira, M. D. Carvalho, T. Jazedje, O. K. Okamoto, A. R. Muotri and M. Zatz (2008). "Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!" Stem Cells **26**(1): 146-150.

Selim, A. O., S. A. Selim, S. M. Shalaby, H. Mosaad and T. Saber (2016). "Neuroprotective effects of placenta-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis." Cytotherapy **18**(9): 1100-1113.

Shalaby, S. M., N. A. Sabbah, T. Saber and R. A. Abdel Hamid (2016). "Adipose-derived mesenchymal stem cells modulate the immune response in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis model." IUBMB Life **68**(2): 106-115.

Shi, Y., J. Su, A. I. Roberts, P. Shou, A. B. Rabson and G. Ren (2012). "How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses." Trends Immunol **33**(3): 136-143.

Shimajima, C., H. Takeuchi, S. Jin, B. Parajuli, H. Hattori, A. Suzumura, H. Hibi, M. Ueda and A. Yamamoto (2016). "Conditioned Medium from the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." J Immunol **196**(10): 4164-4171.

Spaggiari, G. M., H. Abdelrazik, F. Becchetti and L. Moretta (2009). "MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2." Blood **113**(26): 6576-6583.

Tafreshi, A. P., N. Payne, G. Sun, A. Sylvain, K. Schulze and C. Bernard (2014). "Inactive GSK3beta is disturbed in the spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis, but rescued by stem cell therapy." Neuroscience **277**: 498-505.

Torkaman, M., M. Ghollasi, M. Mohammadnia-Afrouzi, A. Salimi and A. Amari (2017). "The effect of transplanted human Wharton's jelly mesenchymal stem cells treated with IFN-gamma on experimental autoimmune encephalomyelitis mice." Cell Immunol **311**: 1-12.

Uccelli, A., L. Moretta and V. Pistoia (2008). "Mesenchymal stem cells in health and disease." Nat Rev Immunol **8**(9): 726-736.

Valtieri, M. and A. Sorrentino (2008). "The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis." J Cell Physiol **217**(2): 296-300.

Wang, X., E. A. Kimbrel, K. Ijichi, D. Paul, A. S. Lazorchak, J. Chu, N. A. Kouris, G. J. Yavanian, S. J. Lu, J. S. Pachter, S. J. Crocker, R. Lanza and R. H. Xu (2014). "Human ESC-derived MSCs outperform bone marrow MSCs in the treatment of an EAE model of multiple sclerosis." Stem Cell Reports **3**(1): 115-130.

Wang, X., A. S. Lazorchak, L. Song, E. Li, Z. Zhang, B. Jiang and R. H. Xu (2016). "Immune modulatory mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells through a trophoblast-like stage." Stem Cells **34**(2): 380-391.

Warburton, D., L. Perin, R. Defilippo, S. Bellusci, W. Shi and B. Driscoll (2008). "Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration." Proc Am Thorac Soc **5**(6): 703-706.

Zhang, M. J., B. Liu, W. Xia, Z. Y. Sun and K. H. Lu (2009). "Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies?" Med Hypotheses **72**(3): 252-254.

Zhang, W., W. Ge, C. Li, S. You, L. Liao, Q. Han, W. Deng and R. C. Zhao (2004). "Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." Stem Cells Dev **13**(3): 263-271.

Zhou, L., Ivanov, I., R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard and D. R. Littman (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." *Nat Immunol* **8**(9): 967-974.

Sites visitados:

- Multiple Sclerosis International Federation: Disponível em <https://www.msif.org/about-us/who-we-are-and-what-we-do/advocacy/atlas/>

Anexos

- The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models.

Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Russo, F.B., Freitas, B.C., Dias, J.L., Guimarães, K.P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G.C., Romero, S., Polonio, C.M., Cunha, I., **Freitas, C.L.**, Brandão, W.N., Rossato, C., Andrade, D.G., Faria, D.P., Garcez, A.T., Buchpigel, C.A., Braconi, C.T., Mendes, E., Sall, A.A., Zanotto, P.M., Peron, J.P., Muotri, A.R., Beltrão-Braga, P.C.

- Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects.

Polonio, C.M., **de Freitas, C.L.**, Zanluqui, N.G., Peron, J.P.S.

The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models

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

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

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

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

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

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

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

*These authors contributed equally to this work.

REVIEW

Open Access

Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects



Carolina Manganeli Polonio, Carla Longo de Freitas, Nagela Ghabdan Zanluqui and Jean Pierre Schatzmann Peron*

Abstract

Viral infections have long been the cause of severe diseases to humans, increasing morbidity and mortality rates worldwide, either in rich or poor countries. Yellow fever virus, H1N1 virus, HIV, dengue virus, hepatitis B and C are well known threats to human health, being responsible for many million deaths annually, associated to a huge economic and social cost. In this context, a recently introduced flavivirus in South America, called Zika virus (ZIKV), led the WHO to declare in February 1st 2016 a warning on Public Health Emergency of International Concern (PHEIC). ZIKV is an arbovirus of the *Flaviviridae* family firstly isolated from sentinels *Rhesus* sp. monkeys at the Ziika forest in Uganda, Africa, in 1947. Lately, the virus has well adapted to the worldwide spread *Aedes aegypti* mosquito, the vector for DENV, CHIKV, YFV and many others. At first, it was not considered a threat to human health, but everything changed when a skyrocketing number of babies born with microcephaly and adults with Guillain-Barré syndrome were reported, mainly in northeastern Brazil. It is now well established that the virus is responsible for the so called congenital Zika syndrome (CZS), whose most dramatic features are microcephaly, arthrogryposis and ocular damage. Thus, in this review, we provide a brief discussion of these main clinical aspects of the CZS, correlating them with the experimental animal models described so far.

Keywords: Zika virus, Congenital infection, Arthrogryposis, Ocular abnormality, Experimental models

Background

Since the first semester of 2015, Brazil has experienced some unprecedented epidemics of babies born with microcephaly as well as of adults with peripheral flaccid paralysis, suggestive of Guillain-Barré syndrome (GBS). The first cases were detected in the states of Bahia, Pernambuco and Paraíba, which are still now the epicenter of the crisis. Although many possibilities were considered, it is now well established that both are caused by a recently introduced virus named Zika virus (ZIKV) [1–4].

The ZIKV is an arbovirus that belongs to the *Flaviviridae* family. It was first isolated from sentinels *Rhesus* sp. monkeys from the Ziika forest in Uganda, Africa, in 1947 [5]. Further, the virus was also isolated from the sylvatic vector, a mosquito of *Aedes africanus* species. Interestingly, the virus has well adapted to other species of mosquitoes, but most importantly to *Aedes aegypti* [6], widely spread through the globe, and a well-known vector for

many other viruses, including dengue (DENV), West Nile (WNV), yellow fever (YFV), chikungunya (CHV), Japanese encephalitis (JEV) and many others [7, 8].

ZIKV genome is composed of a positive single-stranded RNA that codifies three structural proteins, capsid (C), pre-membrane (Pr-M) and envelope (Env), and seven non-structural proteins, NS1, NS2a-2b, NS3, NS4a-4b and NS5 [9]. The biological function of these proteins, either in the invertebrate or in vertebrate hosts have just started to be elucidated. Whereas structural proteins are important molecules for cell invasion [10–12], and to induce the immune response, non-structural proteins are important for viral replication and immune response evasion [13, 14]. Recently, it was shown that ZIKV infectivity of *Aedes aegypti* depends on NS1 antigenemia. Interestingly, the Asian strain is much more infectious to mosquitoes than the African strain, mainly due to an alanine-to-valine amino acid substitution at the residue 188 of the NS1 [15].

Although ZIKV is considered an emerging infectious disease, it has been neglected for many years since human infection was early reported in Africa and Asia

* Correspondence: jeanpierre@usp.br
NeuroImmune Interactions Laboratory, Immunology Department – ICB IV,
University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade
Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.