

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS IN VITRO PELAS
CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

DIEGO PETROCINO CAETANO

Botucatu – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS IN VITRO
PELAS CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS DERIVADAS DO
TECIDO ADIPOSE

DIEGO PETROCINO CAETANO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Botucatu – SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Caetano, Diego Petrocino.

Potencial de inibição da proliferação de linfócitos in vitro pelas células tronco mesenquimais caninas derivadas do tecido adiposo / Diego Petrocino Caetano. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501003

1. Cães. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Doenças autoimunes. 4. Regeneração. 5. linfócitos. 6. Medicina regenerativa.

Palavras-chave: Autoimune; Pbmnc; Reação mista de leucócitos; Regeneração.

Título: POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS IN VITRO PELAS CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS DE TECIDO ADIPOSEO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim
Membro da Banca
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dra Márjorie de Assim Golim
Membro da Banca
Núcleo de Pesquisa do Hospital das Clínicas
FMB – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Data da defesa: 04 de dezembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família: minha esposa Tatiane que abraçou minha ideia maluca de largar emprego e mudar de cidade, em busca de um sonho meu; minha mãe Eliana, minha irmã Fernanda, que mesmo de longe, sempre estiveram apoiando, perguntando, e incentivando sobre todos os processos em que me envolvi.

Ao professor e orientador Rogério, que sequer me conhecia antes de começarmos a conversar sobre o processo seletivo do mestrado, por toda paciência e orientação tanto técnica quanto burocrática.

A todos os amigos da UNESP que acompanharam essa jornada; o Vinícius, que me acompanhou em vários contratempos no laboratório; professora Márjorie e Aline do laboratório de citometria, por todo o conhecimento e acompanhamento de leitura das amostras.

E a todos os familiares e amigos que acompanharam e incentivaram o andamento do mestrado, desde o processo seletivo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da ação das MSCs sobre linfócitos. Quando há contato direto, a inibição da proliferação das células T se dá por ligações de proteínas de membrana, além de secreção de citocinas e fatores solúveis; quando não há contato direto, por exemplo por separação física por membranas transwell, a inibição se torna mais limitada, ocorrendo somente pelas citocinas e fatores solúveis.....	11
Figura 2: Teste de MLR. Linfócitos de cães saudáveis foram plaqueados com AT-MSCs e PMSCs provenientes de banco de células já caracterizadas, em situações com e sem contato direto.....	18
Figura 4: Citometria de fluxo PBMCs em co-cultura com uma das linhagens de MSCs, demonstrando fases do ciclo celular de linfócitos T mantidos em cultura. Nota-se uma redução da Fase S (proliferativa) de linfócitos quando em co-cultura com MSCs. Todas as culturas continham o mitogênico Concanavalina A. Análise feita em citômetro de fluxo.....	21
Figura 5: Fases do ciclo celular comparando as co-culturas com PBMCs e MSCs em contato direto e indireto. Os gráficos apresentam proporções normalizadas em relação à cultura sem MSCs, ou seja, somente PBMCs e ConA. A: Debris + apoptose celular; B: Fase S (proliferativa) do ciclo celular; C: Fase G0/G1; D: Fase G2/M. * indica diferença estatística ($p < 0.05$).....	21
Figura 6: Médias e desvio padrão de contagem de linfócitos por citometria de fluxo, normalizada com base na contagem de cultura de PBMCs. Todas as contagens são referentes a culturas com ConA.....	22
Figura 3: Co-culturas de PBMCs. Nas figuras c e d é possível observar as MSCs aderidas. a: PBMCs; b: PBMCs + ConA; c: PBMCs: ConA + MSCs; d: PBMCs + ConA + MSCs + transwell.....	22

LISTA DE ABREVIACÕES

APC = Células Apresentadoras De Antígenos
AT-MSC = Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo
BDNF = Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Breg = Célula B Reguladora
BTLA = Atenuador de Linfócitos B e T
CCL2 = Quimiocina De Motivo C-C Ligante 2
ConA = Concanavalina A
CTLA-4 = Receptores Antígeno 4 Associado ao Linfócito T Citotóxico
DC = Célula Dendrítica
EAE = Encefalomielite Autoimune Experimental
EM = Esclerose Múltipla
EPHB2 = Produtor De Eritropoietina B 2
EPHB4 = Produtor De Eritropoietina B 4
Fas = Proteína Transmembrânica Indutora de Apoptose
FasL = Ligante de Proteína Transmembrânica Indutora de Apoptose
HGF = Fator de Crescimento de Hepatócitos
HLA-G = Antígeno De Locus De Histocompatibilidade-g
HO-1 = Heme Oxigenase 1 (HO-1)
IDO = Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ = Interferon-Gama
IL-1 = Interleucina 1
IL-10 = Interleucina 10
IL-17 = Interleucina 17
IL-1 β = Interleucina-1 Beta
IL-2 = Interleucina 2
IL-33 = Interleucina 33
IL-6 = Interleucina 6
IL-7 = Interleucina 7
IL1RA = Antagonista Do Receptor De Interleucina-1
ILC = Célula Linfoide Inata
LAG3 = Gene de Ativação de Linfócitos 3
MDSC = Célula Mieloide Supressora Derivadas
MEN = Meningoencefalite Granulomatosa

MHC = Complexo Principal de Histocompatibilidade
MLR = Reação Mista de Leucócitos
MSC = Mesenchymal Stem Cells - Células Tronco Mesenquimais
MUO = Meningoencefalites de Origem Desconhecida
NGF = Fator De Crescimento Nervoso
NK = Natural Killer
NKT = Célula T Natural Killer
NO = Óxido Nítrico
NT-3 = Neurotrofina 3
PBMC = Células Mononucleares de Sangue Periférico
PD-1 = Proteína de Morte Celular Programada 1
PD-L1 = Ligante 1 de Proteína de Morte Celular Programada 1
PD-L2 = Ligante 2 de Proteína de Morte Celular Programada 1
PGE2 = Prostaglandina E2
TCR = Receptores de Células T
TGF- β = Fator de Crescimento Transformador β
Th = Célula T Helper
Th1 = Célula T Auxiliar Tipo 1
Th17 = Célula T Auxiliar Tipo 17
Th2 = Célula T Auxiliar Tipo 2
TIM-1 = Domínios de Mucina e Imunoglobulina de Célula T 1
TIM-2 = Domínios de Mucina e Imunoglobulina de Célula T 2
TIM-3 = Domínios de Mucina e Imunoglobulina de Célula T 3
TIM-4 = Domínios de Mucina e Imunoglobulina de Célula T 4
TNF- α = Fator De Necrose Tumoral Alfa
Treg = Células T Reguladoras
TSG6 = Gene 6 Estimulado Pelo Fator De Necrose Tumoral
VEGF = Fator De Crescimento Endotelial Vascular
 μg = Microgramas
 μL = Microlitros

RESUMO

A terapia com células-tronco mesenquimais (MSCs) tem se demonstrado uma biotecnologia promissora em medicina regenerativa, principalmente pelo seu potencial imunomodulador. Sua ação ocorre por diversos mecanismos, como secreção de fatores solúveis e interação direta entre células. Dentre as diversas interações, a redução da proliferação de linfócitos T é fundamental para controle de doenças autoimunes em geral. Dentre as formas de avaliar o potencial imunomodulador das MSCs *in vitro*, destaca-se o teste de reação mista de leucócitos (MLR), que avalia a inibição da proliferação de leucócitos, particularmente linfócitos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o ciclo celular e o potencial de inibição da proliferação de linfócitos estimulados com concanavalina A, quando em co-cultura (em contato direto e indireto) com MSCs derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs) canino e células monocleares de sangue periférico (PBMC). Para tal, foram realizados testes MLR utilizando-se PBMCs provenientes de cães doadores clinicamente saudáveis obtidas por meio de gradiente de separação com Histopaque 1077, em co-cultura com AT-MSCs caninas (n=4). Foram realizadas culturas em duplicatas de PBMCs (10^6 células por poço), PBMCs estimuladas com concanavalina A (10^6 células + 5ug/mL de ConA), PBMCs estimuladas com concanavalina A em co-cultura direta com AT-MSCs (10^6 PBMCs + 5ug/mL de ConA + 2×10^5 AT-MSCs), e PBMCs estimuladas com concanavalina A em co-cultura indireta (membranas transwell) com AT-MSCs (10^6 PBMCs + 5ug/mL de ConA + 2×10^5 AT-MSCs). As placas foram mantidas em cultivo por 96h, sendo adicionado BrdU nas últimas 24h. Em seguida, as amostras dos cultivos foram incubadas com anticorpos anti-CD3 canino, anti-BrdU e 7-AAD para avaliação por citometria de fluxo. As AT-MSCs caninas em co-cultura com as PBMCs induziram a redução da fase proliferativa dos linfócitos CD3+, possivelmente deslocando-os para a fase G0/G1 do ciclo celular. A redução da fase proliferativa dos linfócitos CD3+ foi evidenciada tanto nas co-culturas de AT-MSCs e PBMCs com contato direto quanto indireto, indicando que os mecanismos de ação também dependem de

mediadores químicos secretados no meio. Apesar de não observarmos diferença estatística, houve tendência de inibição da proliferação de linfócitos CD3⁺ estimulados com concanavalina A quando em contato direto e indireto com as AT-MSCs. Nossos resultados indicam que as AT-MSCs caninas apresentam potencial imunomodulador. Novos estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos de ação imunomoduladores das AT-MSCs caninas sobre linfócitos.

Palavras-chave: PBMC, reação mista de leucócitos, autoimune, linfócito CD3⁺

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy has been shown to be a promising biotechnology in regenerative medicine, mainly due to its immunomodulatory potential. Its action occurs through several mechanisms, such as secretion of soluble factors and direct interaction between cells. Among the various interactions, the reduction of T lymphocyte proliferation is fundamental for the control of autoimmune diseases in general. Among the ways to evaluate the immunomodulatory potential of MSCs in vitro, the mixed leukocyte reaction test (MLR) is one of the most important, which evaluates the inhibition of leukocyte proliferation, particularly lymphocytes. The aim of this study was to evaluate in vitro the cell cycle and proliferation inhibition potential of lymphocytes stimulated with concanavalin A, when in co-culture (in direct and indirect contact) with canine adipose tissue-derived MSCs (AT-MSCs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). For this purpose, MLR tests were performed using PBMCs from clinically healthy donor dogs obtained through separation gradient with Histopaque 1077, in co-culture with canine AT-MSCs (n=4). Cultures were performed in duplicates of PBMCs (10^6 cells per well), PBMCs stimulated with concanavalin A (10^6 cells + 5ug/ml ConA), PBMCs stimulated with concanavalin A in direct co-culture with AT-MSCs (10^6 PBMCs + 5ug/ mL of ConA + 2×10^5 AT-MSCs), and PBMCs stimulated with concanavalin A in indirect co-culture (transwell membranes) with AT-MSCs (10^6 PBMCs + 5ug/mL of ConA + 2×10^5 AT-MSCs). The plates were kept in culture for 96h, with BrdU being added in the last 24h. Then, culture samples were incubated with anti-CD3 canine, anti-BrdU and 7-AAD antibodies for evaluation in flow cytometry. Canine AT-MSCs in co-culture with PBMCs induced a reduction in the proliferative phase of CD3+ lymphocytes, possibly shifting them to the G0/G1 phase of the cell cycle. The reduction in the proliferative phase of CD3+ lymphocytes was evidenced both in co-cultures of AT-MSCs and PBMCs with direct and indirect contact, indicating that the mechanisms of action also depend on chemical mediators secreted in the medium. Although we did not observe any statistical difference, there was a tendency to inhibit the proliferation of CD3+ lymphocytes stimulated with

concanavalin A when in direct and indirect contact with AT-MSCs. Our results indicate that canine AT-MSCs have immunomodulatory potential. New studies must be carried out to elucidate the immunomodulatory mechanisms of action of canine AT-MSCs on lymphocytes.

Keywords: PBMC, mixed lymphocyte reaction, autoimmune, CD3+ lymphocyte

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Papel de Linfócitos T em Doenças Autoimunes.....	3
2.2	Citocinas e Fatores Solúveis Relevantes.....	6
2.3	Potencial Imunomodulador de Células Tronco Mesenquimais (MSCs).....	10
2.4	Potencial Terapêutico das MSCs.....	12
2.5	Relevância Clínica.....	13
2.6	Teste de Reação Mista de Leucócitos – Mixed Leukocyte Reaction (MLR).....	15
3	OBJETIVOS.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1	Amostras de AT-MSCs.....	17
4.2	Amostras de PBMCs.....	17
4.3	Teste de Reação Mista de Leucócitos (MLR).....	18
4.4	Análise do Ciclo Celular.....	19
4.5	Análise Estatística.....	19
5	RESULTADOS.....	21
5.1	AT-MSCs promovem alteração do ciclo celular dos linfócitos T CD3+.....	22
5.2	A ação das AT-MSCs não dependeu do contato direto com os linfócitos T CD3.....	22
5.3	Contagem de linfócitos T CD3 ativados.....	22
6	DISCUSSÃO.....	24
7	CONCLUSÃO.....	26
8	REFERÊNCIAS.....	27
9	ANEXOS.....	40
9.1	TABELA DE LEITURAS DE BRDU-APC OBTIDAS EM CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
9.2	ANEXO II – ATESTADO DE APROVAÇÃO NA CEUA – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	42

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A manutenção da homeostase imunológica no organismo se mantém sob controle de um complexo e desenvolvido processo de regulação. Sua disfunção pode ser um fator crítico no desenvolvimento de condições autorreativas e potencialmente fatais (KYURKCHIEV, 2014). O sistema imunológico trabalha constantemente para combater as moléculas agressoras no organismo, havendo um refinado equilíbrio entre o processo de autotolerância e autoimunidade. Sempre que o equilíbrio é desviado da autotolerância, a autoimunidade se desenvolve, podendo levar a doenças autoimunes (KHAN; GHAZANFAR, 2018). Uma compreensão completa dos mecanismos precisos subjacentes a esse processo imunorregulador pode abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos mais adequados e eficazes para estas doenças (KYURKCHIEV, 2014).

As células-tronco mesenquimais (MSCs), também conhecidas como células estromais mesenquimais, são células fusiformes com capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens de células especializadas, como condrócitos, osteoblastos e adipócitos, e de autorrenovação (DOMINICI et al., 2006). Essas células são derivadas de vários tecidos adultos (WANG et al., 2014), em cultivo aderem-se a placas de cultura de tecidos de plástico e expressam marcadores de superfície celular. Tem sido demonstrado que as MSCs também representam um tipo de célula capaz de prevenir a superestimulação do sistema imunológico através da inibição de proliferação de alguns leucócitos (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

Doenças imunomediadas são caracteristicamente crônicas e muitas vezes sem cura, representando um desafio para a rotina médica. As doenças neuroimunes são particularmente difíceis de se obter resultados expressivos, tanto em humanos quanto em animais. Diversos mecanismos estão envolvidos em suas patogenias, e destes, a ativação de Linfócitos T contra antígenos próprios é um dos mais estudados. Nesse ponto, a terapia celular com Células Tronco Mesenquimais tem se mostrado uma alternativa viável de tratamento, mas ainda há muitos pontos a serem esclarecidos acerca de suas atividades. Com este trabalho, esperamos avaliar o

potencial de MSCs em inibir a proliferação de Linfócitos T *in vitro* e, com isso, ter uma melhor compreensão dos mecanismos imunorregulatórios das células tronco mesenquimais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A autoimunidade é definida como uma resposta imune dirigida contra um antígeno dentro do organismo do hospedeiro. Essas doenças são complexas quanto à sua etiologia, patogênese, apresentação clínica e modalidades de tratamento. Doenças autoimunes são condições crônicas iniciadas pela perda da tolerância imunológica a autoantígenos e representam um grupo heterogêneo de doenças que podem ser específicas de um órgão ou envolver múltiplos sistemas de órgãos dentro de um hospedeiro (ANAYA, 2012; KHAN; GHAZANFAR, 2018). No caso de distúrbios autoimunes, os mecanismos regulatórios são disfuncionais e podem servir como potenciais vias de intervenção terapêutica (ZHANG; VIGNALI, 2016). É crucial entender os mecanismos pelos quais o corpo mantém a tolerância imunológica antes de explicar detalhadamente a patogênese da própria autoimunidade (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

Vários fatores desempenham um papel importante no desenvolvimento da autoimunidade, incluindo suscetibilidade genética, estímulos ambientais e fatores do hospedeiro (KHAN; GHAZANFAR, 2018). Em vários pontos, as MSCs têm atuação importante, indo desde a resposta inata até a adaptativa. Destes, destacam-se a ação sobre linfócitos T e a produção de citocinas e fatores solúveis (WANG et al., 2014). As MSCs, estimuladas por fatores pró-inflamatórios, podem reduzir a proliferação de linfócitos autorreativos e modificar o microambiente em que se encontram, tanto por ação direta entre células quanto por secreção de citocinas e fatores solúveis anti-inflamatórios, além da redução de fatores pró-inflamatórios. Dessa forma inibem a sobre-estimulação do sistema imunológico e melhoram a homeostase imune (JIANG; XU, 2020).

2.1 Papel de Linfócitos T em Doenças Autoimunes

As células T são um dos fatores mais importantes na patogênese da autoimunidade (KHAN; GHAZANFAR, 2018). Para que um linfócito se torne autorreativo, ou seja, passe a reconhecer antígenos próprios como prejudiciais, ele precisa burlar várias etapas do sistema imune que buscam induzir sua autodestruição (SCHWARTZ, 2012). Esses mecanismos são chamados de mecanismos de autotolerância ou tolerância imunológica, e eliminam ou inativam linfócitos com receptores capazes de reconhecer autoantígenos (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

Primariamente, durante o desenvolvimento e maturação dos linfócitos nos órgãos linfoides centrais (timo para células T e medula óssea para células B), os linfócitos auto-reativos são reconhecidos e destruídos por mecanismos chamados de tolerância central (KAMRADT; MITCHISON, 2001). Ocasionalmente, células T autorreativas escapam da tolerância central e entram na circulação periférica. Nesses casos, existem ainda outros mecanismos que podem neutralizar essas células T autorreativas para prevenir a autoimunidade. Esses mecanismos são chamados coletivamente de tolerância periférica (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

A anergia é um desses mecanismos. Anergia é um fenômeno pelo qual os linfócitos que reconhecem autoantígenos tornam-se funcionalmente não responsivos. A ativação das células T requer o reconhecimento do antígeno pelos Receptores de Células T (TCR), bem como pelas moléculas coestimuladoras presentes nas células T. Uma das vias coestimuladoras mais proeminentes é o eixo CD28:B7 que promove a proliferação e sobrevivência de células T através da amplificação da sinalização do TCR e da produção de interleucina-2 (IL-2) (LAFFERTY; CUNNINGHAM, 1975). Porém, o reconhecimento prolongado do antígeno sozinho, sem a ativação dessas vias coestimuladoras, pode levar à anergia (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Isso ocorre se um estímulo antigênico normal for recebido por tempo prolongado e/ou for recebido na ausência de coestimulação ou a partir de um estímulo TCR alterado e/ou crônico (CHOI; SCHWARTZ, 2007). Dessa forma, as células T deixam de responder quando são continuamente exibidas

aos autoantígenos na ausência de imunidade inata e forte coestimulação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Outro mecanismo é a chamada exclusão. As células T autorreativas que reconhecem autoantígenos sofrem apoptose em vez de ativação (KHAN; GHAZANFAR, 2018). Tanto a proteína transmembrânica indutora de apoptose Fas quanto seu ligante, FasL, estão presentes nos linfócitos T. A exclusão, mecanismo de sinalização gerido por elas, tem extrema importância no controle de células autorreativas. Mutações no gene Fas que regula a apoptose dos linfócitos induz à Síndrome Linfoproliferativa Autoimune, caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento de doenças autoimunes e linfoproliferativas (KUEHN et al., 2011).

Além da inibição de receptores estimuladores das células T, que ocorre na anergia e na exclusão, há também a ação de receptores inibitórios na regulação da autoimunidade. Entre eles, os receptores Antígeno 4 Associado ao Linfócito T Citotóxico (CTLA-4) e Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1) continuam sendo os mais estudados e também possuem grandes implicações terapêuticas (KHAN et al., 2017). O CTLA-4 é um receptor inibitório que está presente nas células T. O CTLA-4 é induzido após ativação em células T convencionais CD4⁺ e CD8⁺; no entanto, é constitutivamente expresso na Treg (LEACH; KRUMMEL; ALLISON, 1996). A PD-1 é outro receptor inibitório muito bem estudado e importante que interrompe a resposta imune e, portanto, impede que as células T autorreativas causem danos aos órgãos normais. O PD-1 é expresso em várias células, incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺, células natural killer, células T natural killer, células B, macrófagos e também alguns subconjuntos dendríticos. PD-1 reconhece dois ligantes, PD-L1 e PD-L2. Tanto PD-L1 quanto PD-L2 são expressos em várias células de origem hematopoiética e não hematopoiética (KHAN; GHAZANFAR, 2018). Curiosamente, tanto a CTLA-4 quanto a PD-1 são estimuladas por células neoplásicas, para impedir a atuação de células imunes contra elas (LEACH; KRUMMEL; ALLISON, 1996).

Além destes, há outros receptores inibitórios. O atenuador de linfócitos B e T (BTLA) é semelhante ao CTLA-4 (KHAN; GHAZANFAR, 2018). É expresso por células T helper 1. A reticulação do BTLA com o receptor de antígeno leva à

fosforilação da tirosina e ao recrutamento de proteínas tirosina fosfatases contendo SH2 e atenua a produção de IL-2. Camundongos deficientes em BTLA apresentam proliferação aumentada de linfócitos T e respostas de anticorpos aumentadas (WATANABE et al., 2003).

O gene de ativação de linfócitos 3 (LAG3) (CD223) é uma molécula inibidora da superfície celular presente em células T ativadas, células NK e células dendríticas. A interação entre LAG3 e seu ligante MHC classe II suprime os linfócitos T CD8+ (GOLDBERG; DRAKE, 2011).

Domínios de Mucina e Imunoglobulina de Célula T 3 (TIM-3) é um membro da família de genes TIM que inclui TIM-1, TIM-2 e TIM-4 em humanos e TIM 1–8 em camundongos. Está envolvido na supressão da sinalização de células T proximais em células T CD4+ e CD8+. Desta forma, está envolvido na mediação da tolerância imunológica (DU et al., 2017). Além disso, menor expressão de TIM-3 em células T e maior produção de interferon (IFN)- γ podem ser detectados em pacientes que sofrem de esclerose múltipla (EM) (YANG et al., 2008).

Em outro âmbito, as Células T Reguladoras (T-regs) são um subconjunto de células T auxiliares, cuja principal função é a regulação ou supressão da resposta imune (BACH, 2003). Experimentos in vitro mostraram que uma vez que Foxp3+CD25+Tregs são ativados por estimulação de TCR por antígeno específico, eles suprimem outras células T CD4 e CD8, independentemente de suas especificidades de antígeno (PICCIRILLO; THORNTON, 2004).

Existem várias maneiras pelas quais as Tregs exercem seu efeito supressor. Alguns desses mecanismos incluem a produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e Fator de Crescimento Transformador (TGF)- β e consumo de IL-2 para privar outras células imunes desse fator de crescimento. Além disso, eles também podem reduzir a estimulação das células T através das células apresentadoras de antígenos (APCs), especialmente por meio da interação com CTLA-4 (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

É importante mencionar a importância de outro subconjunto de Tregs chamado células Tr1 (Salvatore Albani, 2016). Sugere-se que as células Tr1 possam ter um

papel na patogênese subjacente de doenças infecciosas, autoimunidade e rejeição de transplantes (RONCAROLO et al., 2014). Essas células se caracterizam pela produção de IL-10 e pela expressão de CD49b e LAG-3. As células Tr1 suprimem as respostas de APC, bem como as respostas de células T através da secreção de IL-10 e TGF- β . As células Tr1 inibem as respostas das células T por CTLA-4 ou PD-1, interrompendo o estado metabólico das células T efectoras por meio da produção das ectoenzimas CD39 e CD73. Eles também liberam granzima B e perforina e matam as células mieloides (RONCAROLO et al., 2014).

2.2 Citocinas e Fatores Solúveis Relevantes

Algumas vias de ação das MSCs independem de contato direto. Apesar de ainda necessitarem de estudos avançados, algumas dessas vias, mediadas por citocinas e fatores solúveis, são já conhecidas.

Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF): é um mitógeno de hepatócitos descoberto há mais de 35 anos. Essa citocina induz respostas de autorreparação em vários órgãos além do fígado (NAKAMURA; MIZUNO, 2010). Algumas de suas ações incluem promover mitogênese nas vias aéreas pulmonares e alvéolos (OHMACHI; MATSUMOTO; NAKAMURA, 1996), acelerar a cicatrização de lesões gástricas (SCHMASSMANN et al., 1997), manutenção da homeostase e redução de fibrose renal (MIZUNO; NAKAMURA, 2005; MIZUNO; MATSUMOTO; NAKAMURA, 2008), proliferação e formação de colônias de progenitores hematopoiéticos in vitro (MIZUNO et al., 1993), estimulalação da mitogênese e da produção de insulina nas células β pancreáticas (DAI et al., 2003), regeneração da pele (YOSHIDA et al., 2003), dentre outros. Importante notar que o HGF impede ou reduz a formação de fibrose em tecidos lesionados cronicamente (MIZUNO; MATSUMOTO; NAKAMURA, 2008). O HGF é uma das citocinas secretadas pelas MSCs e responsáveis pela imunomodulação e reparação de tecido, apesar de nem todos os mecanismos serem ainda completamente esclarecidos (KANG et al., 2008). Di Nicola et al. (2002) evidenciaram que a produção do HGF é um dos meios pelos quais as MSCs atuam de forma indireta, e em casos de bloqueio ou destruição do HGF, a ação

imunossupressora das próprias MSCs fica comprometida e deixa de ser eficiente na supressão da proliferação de linfócitos.

Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO): contribui para a regulação imunológica por meio de alterações metabólicas locais no microambiente imediato e no tecido local, podendo inclusive impactar o desenvolvimento da tolerância imunológica sistêmica. Sua ação se baseia principalmente em catalisar aminoácidos essenciais que têm catabolismo oxidativo. A IDO inibe a proliferação de células T e promove tolerância imunológica pela depleção de triptofano (MELLOR; MUNN, 2004). Em células T CD8+, a IDO leva indiretamente à parada do ciclo celular e anergia funcional (MUNN et al., 2005) e concomitantemente induz à diferenciação de linfócitos em células Tregs (MANCHES et al., 2008). Sua atividade é detectada em culturas de MSCs, sendo considerada uma das responsáveis por inibir a resposta de células T (MEISEL et al., 2004), embora com diferentes níveis de atividade para diferentes fontes teciduais de células tronco (AMORIM et al., 2020).

Óxido Nítrico (NO): é um fator solúvel produtor por enzimas como Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), que tem atividade supressora de células T. Estudo conduzido por Anderson et al. (2017) evidenciou que a atividade de linfócitos T e células dendríticas foi suprimida pela via do óxido nítrico induzível (iNOS) e da ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1,2) in vitro. Os mesmos autores evidenciaram in vivo uma redução da gravidade e progressão da Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE), também pela diminuição da função das células dendríticas e linfócitos T. As MSCs são capazes de causar uma produção significativa e dependente de dose de NO.

Prostaglandina E2 (PGE2): é um lipídio bioativo que pode provocar uma ampla gama de efeitos biológicos associados à inflamação e ao câncer. A PGE2 tem a capacidade de estimular diversos efeitos biológicos, incluindo proliferação celular, apoptose, angiogênese, inflamação e vigilância imunológica em diferentes tipos celulares em uma ampla variedade de tecidos (NAKANISHI; ROSENBERG, 2013). Também foi demonstrado que inibe a secreção de IL-2 e estimula a diferenciação de linfócitos Treg (ERKERS et al., 2013). As MSCs são capazes de produzir a PGE2.

Além disso, demonstrou-se que a supressão da PGE2 inibe, em parte, a ação de MSCs em co-cultura com PBMCs (AMORIM et al., 2020).

Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF): é uma neurotrofina secretada principalmente por neurônios e células gliais. Atuando diretamente nos neurônios, media a neuroproteção e a neuroregeneração (FRIESE; SCHATTLING; FUGGER, 2014), crescimento axonal, redução de desmielinização, supressão de apoptose de oligodendrócitos, modulação da atividade neuronal, plasticidade sináptica dependente de atividade e plasticidade dendrítica (KODA et al., 2002; MARKUS; PATEL; SNIDER, 2002). No caso de doenças neuroimunes, a falta de BDNF leva a uma neuroproteção prejudicada e, eventualmente, aumento da perda axonal na fase crônica (LINKER et al., 2010). O BDNF demonstrou ser de grande relevância na recuperação de lesões neurológicas, incluindo acidentes vasculares cerebrais infantis (VAN VELTHOVEN et al., 2013) e degenerações de retina e nervo óptico (LEJKOWSKA et al., 2019) em humanos, bem como lesões cerebrais traumáticas (MAHMOOD; LU; CHOPP, 2004) e por Encefalomielite Experimental Autoimune em cobaias (ZHANG et al., 2005). As MSCs tanto produzem diretamente quanto estimulam a produção do BDNF pelo tecido nervoso, embora nem sempre possa ser possível definir exatamente o tipo celular envolvido (ZHANG et al., 2005). Mahmood, Lu e Chopp (2004) fizeram aplicações intravenosas em cobaias com lesão traumática no Sistema Nervoso Central e notaram tanto migração de MSCs para os locais lesionados quanto um aumento considerável de BDNF e Fator de Crescimento de Nervos (NGF) nesses locais. Esse aumento se deu tanto por produção direta pelas MSCs quanto pela estimulação de células nervosas a produzir a neurotrofina. A diferença nos níveis de BDNF se tornou evidente ao quinto dia, e ainda mais notória ao oitavo, culminando com considerável melhora clínica dos animais ao teste de Rotarod após quinze dias. Wang et al. (2017) tiveram resultados semelhantes com pacientes humanos tratados com uso de MSCs em lesões encefálicas traumáticas. A maioria dos pacientes experimentou melhora clínica da função neurológica em diferentes graus, e níveis séricos mais elevados de BDNF e NGF foram detectados após o transplante em comparação com os níveis anteriores ao tratamento.

Interleucina 2 (IL-2): é uma citocina envolvida na função das células T. Ela desempenha um papel importante regulando a expansão clonal de células T e na geração e expansão sustentada de células Treg, células-chave na prevenção da autoimunidade e na manutenção da homeostase imunológica. É uma citocina tipo 1 com quatro feixes α -helicoidais produzidos principalmente por células T CD4⁺ e também por células CD8⁺ e APCs (LIAO; LIN; LEONARD, 2013). Os receptores para IL-2 são expressos por várias células imunes, incluindo células T ativadas, células B e monócitos. Os receptores de IL-2 também podem estar presentes na forma solúvel, que possui baixa afinidade para IL-2 e, consequentemente, capacidade limitada de absorver IL-2 em excesso. Experimentos em animais mostraram que o tratamento com IL-2 aumenta o número de células Treg e melhora a encefalite alérgica e a miastenia gravis (BOYMAN; SPRENT, 2012).

Interleucina 6 (IL-6): é secretada por uma variedade de células e facilita a ativação e diferenciação de linfócitos T e B. IL-6 em combinação com TGF- β estimula a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células Th17. A IL-6 também inibe o desenvolvimento de células T reguladoras induzidas por TGF- β . (TANAKA; KISHIMOTO, 2012).

Interleucina 7 (IL-7): é expressa principalmente pelas células do estroma dos órgãos linfoides primários. Desempenha um papel crítico no desenvolvimento e expansão das células T, que expressam abundantemente os receptores de IL-7. A IL-7 induz a secreção de citocinas associadas a Th1 e Th17 e é responsável pela ativação dependente de células T de macrófagos, células dendríticas e células B. Além disso, a superexpressão de IL-7 ativa as células indutoras do tecido linfóide inato, levando à formação de agregados linfóides ectópicos (BIKKER et al., 2012). Assim, pode atuar como um mediador chave na autoimunidade associada às células T, inflamação crônica e destruição de tecidos (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

A Interleucina 33 (IL-33): é uma proteína de dupla função que atua como citocina e fator nuclear. Ele interage com seu complexo receptor específico receptor ST2 presente na superfície de células Th2, células T CD8⁺, células B, mastócitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas. Induz a produção de IL-5, IL-13, TNF- α , IFN- γ e IL-2 a partir dessas células (ZHAO; CHEN, 2014). Seus níveis

estão elevados em muitas doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide, indicando possível envolvimento em causar autoimunidade e destruição inflamatória nessas doenças (ZHAO; CHEN, 2014).

2.3 Potencial Imunomodulador de Células Tronco Mesenquimais (MSCs)

As Células Tronco Mesenquimais são derivadas de vários tecidos adultos (WANG et al., 2014), anexam-se a placas de cultura de plástico e expressam certos marcadores de superfície celular (positivo para CD73, CD90 e CD105; negativo para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 , e HLA-DR) (DOMINICI et al., 2006). As MSCs podem ser colhidas de indivíduos adultos com segurança, sem grandes preocupações éticas e têm baixa imunogenicidade (WANG et al., 2014).

Curiosamente, o microambiente pode alternar as MSCs entre fenótipos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. As MSCs possuem funções pró-inflamatórias na fase inicial da inflamação através do recrutamento de neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). IFN- γ e TNF- α quando essas duas citocinas atingem um nível alto, estimulam as MSCs a secretar iNOS (camundongos) ou IDO (humano), resultando em inibição da proliferação de células T e indução de Tregs (WANG et al., 2014).

As MSCs regulam muitos tipos de células imunes através dos moduladores imunes expressos por elas, incluindo DC (célula dendrítica), monócito/macrófago, B, Breg (célula B reguladora), T, Treg (célula T reguladora), Th1 (célula T auxiliar, tipo 1), Th2 (célula T auxiliar, tipo 2), Th17 (célula T auxiliar, tipo 17), NK (célula natural killer), NKT (célula T natural killer), ILC (célula linfoide inata), MDSC (célula mieloide-células supressoras derivadas), neutrófilos e mastócitos (NAJAR et al., 2016). As atividades imunossupressoras das MSCs são estimuladas principalmente por fatores pró-inflamatórios, como IFN- γ (interferon gama), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 β (interleucina-1 beta) (BERNARDO; FIBBE, 2013).

MSCs também expressam TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9. Os níveis de expressão desses TLRs variam significativamente com base em sua origem tecidual. Os TLRs reconhecem moléculas de células lesadas ou patógenos que atuam como a primeira linha do sistema de defesa imune. A ativação de TLR pode estimular ainda mais células imunes e MSCs (DELAROSA; DALEMANS; LOMBARDO, 2012).

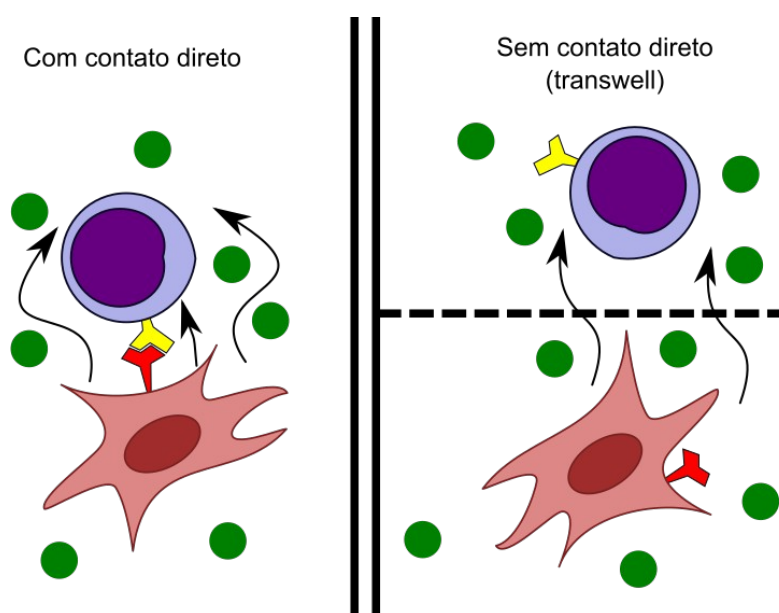


Figura 1: Esquema da ação das MSCs sobre linfócitos. Quando há contato direto, a inibição da proliferação das células T se dá por ligações de proteínas de membrana, além de secreção de citocinas e fatores solúveis; quando não há contato direto, por exemplo por separação física por membranas *transwell*, a inibição se torna mais limitada, ocorrendo somente pelas citocinas e fatores solúveis.

Embora o contato celular direto seja importante para os efeitos imunossupressores das MSCs, estudos mostraram que os moduladores imunológicos expressos pelas MSCs são mais críticos, incluindo indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), antígeno de locus de histocompatibilidade-G (HLA-G), CD39 e CD73, galectinas, quimiocina de motivo C-C ligante 2 (CCL2), ligantes de morte celular programada 1 e 2 (PD-L1 e PD-L2), heme oxigenase 1 (HO-1), gene 6 estimulado pelo fator de necrose tumoral (TSG6), antagonista do

receptor de interleucina-1 (IL1RA) e fator relacionado ao sistema complemento (JIANG; XU, 2020).

2.4 Potencial Terapêutico das MSCs

A habilidade de produzir e secretar diversos fatores bioativos parácrinos confere às MSCs efeitos imunomodulatórios únicos (GONZALEZ-PUJANA et al., 2020). Estes efeitos relacionam-se com a secreção de fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento transformador beta ($TGF\beta$), prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico (NO), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucina 6 (IL-6), anti-inflamatórios e fatores de neuroproteção (CARRADE; BORJESSON, 2013).

As células-tronco mesenquimais inibem a proliferação e ativação de células T, independentemente da espécie e da origem do tecido (KRAMPERA et al., 2006). As MSCs inibem as células T direta ou indiretamente induzindo as células Tr1 supressoras (células CD4+IL-10+) (LIN et al., 2013) e células Treg (CD4+CD25+Foxp3+ ou CD4+IL-10+IFN- γ +) (BERNARDO; FIBBE, 2013; HSU et al., 2013) o que inibiria ainda mais as células T (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). As MSCs expressam o receptor hepatocelular (EPH) produtor de eritropoietina B2 (EPHB2) e efrinaB2, enquanto as células T expressam EPHB4 e efrinaB1 (RAMASAMY et al., 2008). A interação direta entre MSCs e células T através de EPHB2/ephrinB1 e ephrinB2/EPHB4 é essencial para os efeitos imunossupressores, pois o bloqueio dessas interações reduz os efeitos supressores (RAMASAMY et al., 2008). Além disso, essas interações aumentariam a expressão de IDO e iNOS (RAMASAMY et al., 2008). O tratamento com EPHB2 e ephrinB2 diminuiu a expressão de TNF- α , IL-2 e IL-17 em células T em humanos (NGUYEN et al., 2013).

Os efeitos de supressão de células T de MSCs dependem da alta proporção de células de MSCs para células T (KRAMPERA et al., 2003). A baixa proporção de células estimula a proliferação de células T (LE BLANC et al., 2003). As MSCs ativadas expressam PD-L1 e FasL, que inibem a expressão de CD69 e a

proliferação de células T (GU et al., 2013). As MSCs também expressam HLA-G1, TGF- β e HGF para inibir a proliferação de células T através da regulação negativa de fosforetinoblastoma (pRb), ciclina D e ciclina A enquanto regulam positivamente o inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (p27Kip1), resultando na parada do ciclo para a fase G1 (GLENNIE et al., 2005). MSCs podem induzir células T ativadas em apoptose através da conversão de triptofano em quinurenina (PLUMAS et al., 2005). Além disso, as MSCs inibem a proliferação antígeno-específica de células T de memória (KRAMPERA et al., 2003) e induzem células Treg de memória (CD3+CD45RO+) (DI IANNI et al., 2008).

2.5 Relevância Clínica

As células-tronco mesenquimais têm sido aplicadas com sucesso no tratamento de várias doenças, incluindo doenças autoimunes (CIPRIANI et al., 2013). No sistema nervoso, na ausência dos efeitos imunomodulatórios citados, tende a desenvolver-se inflamação crônica, que leva à degeneração e falha dos processos neuroprotetivos/regenerativos, agravando a degeneração retrógrada ou Walleriana e a apoptose/ necrose neuronal (FRIESE; SCHATTLING; FUGGER, 2014; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Ressalta-se que no caso das células tronco, a relevância não se restringe somente à Medicina Veterinária. A contribuição de conhecimento entre veterinários, médicos e outros profissionais da saúde é particularmente importante na área de terapia celular e regenerativa (VOLK; THEORET, 2013), pois doenças neuroimunes em diferentes espécies têm muitos aspectos em comum (GREER et al., 2010). Por exemplo, uma forma de meningoencefalites de origem desconhecida em cães, a meningoencefalite necrosante (MEN), compartilha as mesmas associações genéticas de complexo principal de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex - MHC) classe II que a esclerose múltipla (EM) em humanos (GREER et al., 2010). As formas mais graves da EM em humanos, agudas fulminantes, compartilham características clínicas, patológicas e radiológicas com a MEN canina (GREER et al., 2010)

No caso da esclerose múltipla, inclusive, vários estudos têm sido conduzidos para avaliar diferentes vias de administração, número de células a serem transplantadas, fontes de células, e número de aplicações (MANSOOR et al., 2019). Yamout et al. (2010) e Odinak et al. (2011), relataram que, em pacientes com esclerose múltipla que apresentavam piora clínica mesmo após tratamentos convencionais, a terapia celular promoveu melhora clínica na maioria, ou pelo menos estabilização do quadro. Já no caso de cães, a terapia com MSCs demonstrou resultados promissores em estudos com doença valvar crônica (PETCHDEE; SOMPEEWONG, 2016), osteoartrites (MAKI et al., 2020), síndrome do intestino irritável (PÉREZ-MERINO et al., 2015), dermatite atópica (VILLATORO et al., 2018), ceratoconjuntivite seca (SGRIGNOLI et al., 2019), e meningoencefalites de origem desconhecida (MUO) (ZEIRA et al., 2015).

Cães com MUO refratários ao tratamento imunossupressor apresentaram melhora da condição neurológica e do tempo de sobrevida após o tratamento com BM-MSCs autólogas, usando diferentes vias de aplicação (ZEIRA et al., 2015). Dados sugerem que a MUO canina pode ser utilizada como modelo animal natural da EM, devido à semelhança dos mecanismos neuroimunológicos, principalmente pela expressão de IFN- γ , IL-17 e MHC-II nas lesões neurológicas (GREER et al., 2010; PARK et al., 2013; HOFFMAN, DOW; 2016). Similarmente, a Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE), uma doença autoimune induzida laboratorialmente em cobaias, tem aspectos clínicos semelhantes à Esclerose Múltipla (AL JUMAH; ABUMAREE, 2012). EAE é mediada por células T helper específicas por mielina, que são ativadas na periferia e, em seguida, se translocam para o SNC, causando degeneração imunomediada do tecido (FURTADO et al., 2008). As células-tronco mesenquimais possuem propriedades imunossupressoras que as tornam uma opção terapêutica que pode ser utilizada para modular a imunopatogênese da esclerose múltipla e seu modelo animal, EAE. Portanto, a eficácia das MSCs na atenuação da manifestação encefalitogênica da EAE pela supressão das funções das células T autorreativas que medeiam a inflamação e o dano neuronal foi comprovada (AL JUMAH; ABUMAREE, 2012).

As MSCs também agem estimulando as células T reguladoras (Treg) (MELIEF et al., 2013), que por sua vez promovem diferenciação de oligodendrócitos e (re)mielinização (DOMBROWSKI et al., 2017). Somado a isso, as MSCs estimulam neurogênese e conexões sinápticas por meio de secreção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento nervoso (NGF) e neurotrofina 3 (NT-3) (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). E, embora não seja o fator principal na recuperação funcional do SNC, há também evidências de que as MSCs podem se diferenciar em células neurais em certas condições (PAUL; ANISIMOV, 2013; MALTMAN; HARDY; PRZYBORSKI, 2011; PARR; TATOR; KEATING, 2007).

2.6 Teste de Reação Mista de Leucócitos – Mixed Leukocyte Reaction (MLR)

Para avaliação do potencial terapêutico das MSCs, devem ser feitos ensaios baseados em funcionalidade, se possível de forma (semi-)quantitativa (DE WOLF et al., 2017). Há várias formas de se avaliar in vitro o potencial imunomodulador das MSCs (NICOTRA et al., 2020). Alguns dos testes propostos com essa finalidade são: dosagem de protaglandina E2 (SOLCHAGA; ZALE, 2012), dosagem da glicoproteína CD200 e seu receptor CD200R (NAJAR et al., 2012), ensaio de supressão de leucócitos (AMORIM et al., 2020), e ensaio de reação mista de linfocitária (mixed lymphocyte reaction – MLR) (NICOTRA et al., 2020). O MLR avalia a porcentagem de inibição da proliferação dos linfócitos, e como apresenta baixa variabilidade entre testes, é considerado bastante confiável (NICOTRA et al., 2020).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial in vitro das MSCs caninas derivadas do tecido adiposo (AT-MSC) em inibir a proliferação de linfócitos CD3+.

Objetivos específicos:

- Padronizar o teste de Reação Mista de Leucócitos (MLR).
- Avaliar se há alteração no ciclo celular dos linfócitos CD3+ em co-cultivo com AT-MSCs.
- Avaliar, in vitro, a capacidade das AT-MSCs de inibir a proliferação de linfócitos CD3+ por meio do teste de MLR

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA/FMVZ – Protocolo 0105/2022), e realizado em laboratório na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu – São Paulo. Foram usadas células tronco mesenquimais de tecido adiposo (adipose tissue derived mesenchymal stem cells – AT-MSC), previamente caracterizadas e armazenadas em banco de células do nosso grupo de pesquisa. Para o teste de Reação Mista de Leucócitos, foram utilizados leucócitos provenientes de amostras de sangue de cães saudáveis, distribuídos em até cinco amostras de 10mL cada, para cada doador, cujos tutores tenham concordado e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1 Amostras de AT-MSCs

Foram utilizadas amostras de AT-MSCs de banco de células do Laboratório de Terapia Celular para Enfermidades Neurológicas em Animais Domésticos da FMVZ / UNESP-Botucatu. As células são mantidas em meio de cultivo contendo 88% de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de anfotericina. As células cultivadas tiveram sua multipotencialidade previamente comprovada com a indução para diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, seguindo-se as recomendações dos fabricantes. As células também foram previamente avaliadas quanto a fenótipos de antígenos CD de superfície através de citometria de fluxo com utilização dos marcadores: CD34, CD45, CD44, CD90, e MHC-II.

Foram utilizadas amostras de quarta passagem de AT-MSCs obtidas do banco de células. Essas amostras foram descongeladas e colocadas em cultivo durante uma semana. Após esse período, foram irradiadas ainda na garrafa de cultura em bomba de cobalto por 75 minutos, totalizando uma dose de 2,5Gy, para evitar que se proliferassem durante o experimento. As células foram mantidas em meio de cultivo até o plaqueamento, que ocorreu em 12h após a irradiação.

4.2 Amostras de PBMCs

Foram coletadas amostras de 10mL de sangue periférico de cinco cães doadores com peso de ao menos 15kg por punção venojugular em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O tempo entre coleta e processamento foi de no máximo 2h para todas as amostras. Os tutores dos doadores assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a coleta, as amostras foram diluídas individualmente em DPBS na proporção de 1:1, e cuidadosamente depositadas em uma coluna de 10mL de Histopaque 1077. Então foram centrifugadas com força 700g por 30min em centrífuga refrigerada com desaceleração lenta. A camada de PBMCs que se formou acima do Histopaque 1077, conforme figura 2, foi coletada e lavada três vezes por ressuspensão em 1mL de DPBS e centrifugação em força 300g por 10min, também com desaceleração lenta. Foi retirada uma alíquota de 50uL as PBMCs resultantes para contagem

automatizada, e as células foram mantidas em meio de cultivo e armazenadas em gelo até o plaqueamento, que ocorreu em 2h.

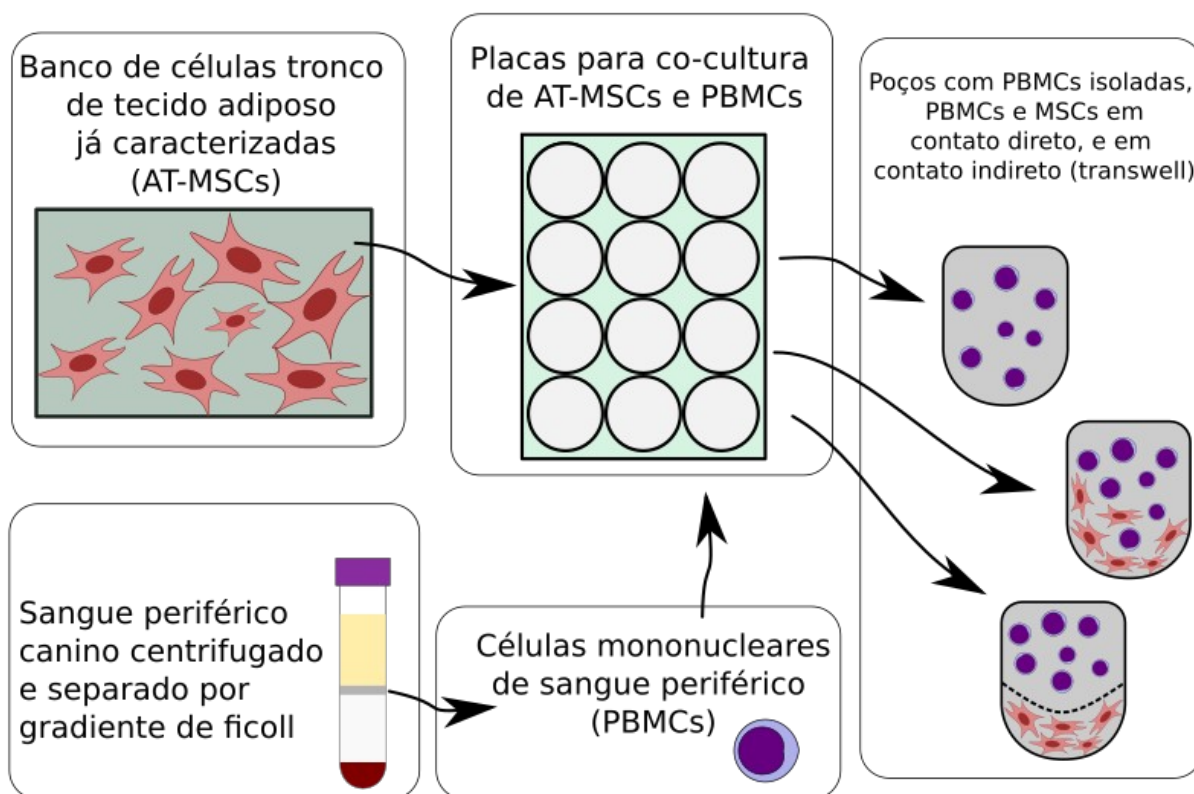


Figura 2: Teste de MLR. Linfócitos de cães saudáveis foram plaqueados com AT-MSCs e PMSCs provenientes de banco de células já caracterizadas, em situações com e sem contato direto.

4.3 Teste de Reação Mista de Leucócitos (MLR)

Foi realizado o ensaio de reação mista de leucócitos (MLR), com resultados avaliados por citometria de fluxo, baseado na descrição de Amorim et. al (2020). O ensaio foi realizado quatro vezes, de forma idêntica, mas com AT-MSCs e PBMCs de doadores diferentes.

Apesar do objetivo ser avaliar a população de linfócitos T CD3+, a interação destas células com outras células mononucleares é de grande importância. Dessa forma, optou-se por utilizar PBMCs e não somente linfócitos. Conforme a figura 2, as AT-MSCs caninas foram plaqueadas em co-cultura com as PBMCs (Células

mononucleares de Sangue Periférico) na razão AT-MSc:PBMC 1:5. Foram utilizadas 200.000 MSCs e 10^6 PBMCs por poço, com volume de meio de 1,5 mL. Foram preparados poços em quatro situações diferentes, conforme Tabela 1: PBMCs isoladas; PBMCs com Concanavalina A (ConA); PBMC e MSCs em contato direto; e PBMCs e MSCs sem contato direto, separadas por placas transwell. Todas as amostras foram feitas em duplicatas. A concentração de Concanavalina A utilizada foi de 5 μ g/mL. Após 3 dias em co-cultura, os poços foram tratados com bromodesoxiuridina 1 mM (BrdU, BD Biosciences), e então mantidas em cultura por mais 24 horas. Todas as amostras foram marcadas com anticorpos anti-BrdU marcado com fluorocromo APC e 7-AAD (BrdU FlowKit, BD Biosciences), exatamente conforme instruções do fabricante; e também com anticorpo anti-CD3 canino conjugado com FITC (CD3e Monoclonal Antibody (CA17.2A12), ThermoFisher Scientific). As amostras então foram analisadas em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson Company). Também foram mantidas culturas de PBMCs que passaram por todo o mesmo tratamento, incluindo a utilização de BrdU, mas sem adição dos demais marcadores, para controle de negativo na citometria.

4.4 Análise do Ciclo Celular

Foi feita análise do ciclo celular dos linfócitos T CD3⁺ coletados, através da incorporação de BrdU e 7-AAD (BrdU APC Flow Kit – BD Biosciences). O BrdU se liga no DNA celular, e ao ser quantificado no final através de anticorpos anti-BrdU, tem valores diretamente proporcionais à quantidade de células que passaram por mitose. Além disso, o BrdU/7-AAD diferencia células que estejam na fase G0/G1 (repouso/crescimento), G2/M (fase mitótica), Fase S (duplicação de DNA), e debris celulares / apoptose (SCHORL; SEDIVY, 2007).

4.5 Análise Estatística

A análise dos dados foi feita na linguagem de programação R. Os experimentos foram realizados com um n total = 4, sendo cada amostra feita em duplicata e considerando-se para a estatística a média das duplicatas. A significância estatística entre dois grupos foi determinada pelo teste não paramétrico de Mann-

Whitney-Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

O teste de citometria foi utilizado para avaliar a proliferação celular. Os linfócitos foram analisados quanto ao índice de proliferação (Fase S), havendo menor proliferação nas co-culturas com AT-MSCs e AT-MSCs em poços transwell. Antes do processamento final das amostras, as placas de cultura foram fotografadas (figura 3). As médias dos resultados obtidos, que foram feitos em duplicatas, estão expostas na tabela do ANEXO I. Fotomicrografias das culturas estão representadas na figura 3.

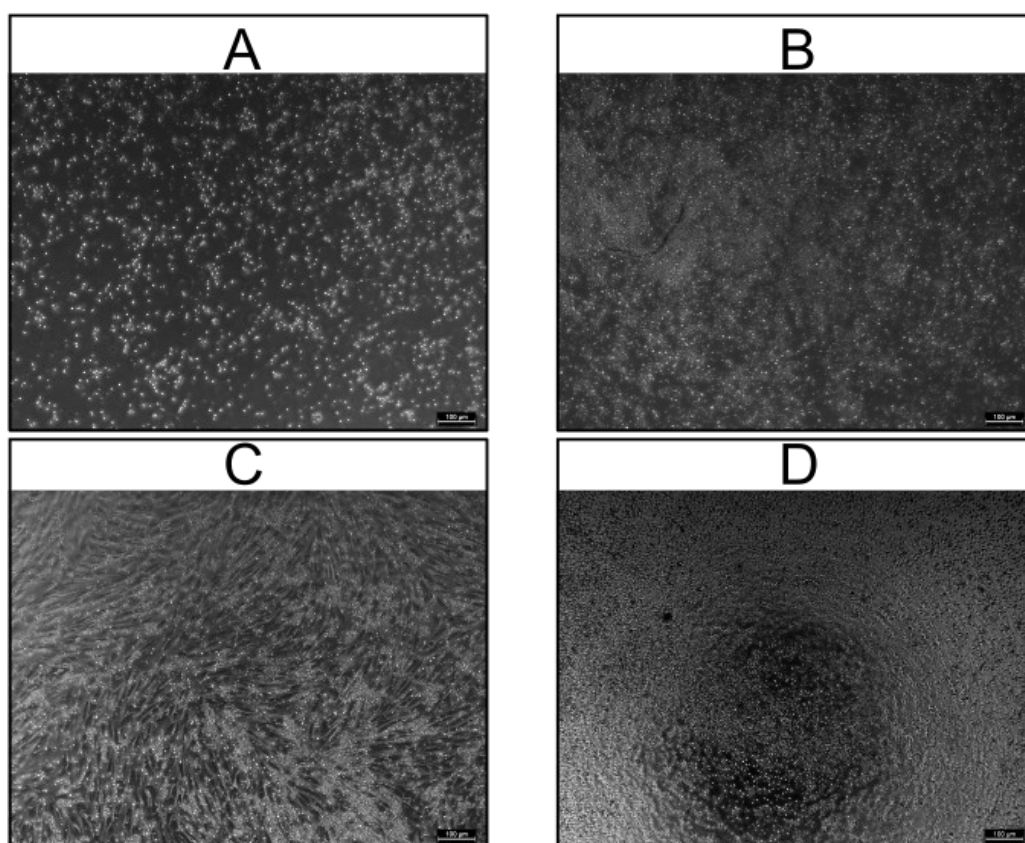


Figura 3: Co-culturas de PBMCs. Nas figuras **c** e **d** é possível observar as AT-MSCs caninas aderidas. **a:** PBMCs; **b:** PBMCs + ConA; **c:** PBMCs: ConA + AT-MSCs; **d:** PBMCs + ConA + AT-MSCs + transwell.

5.1 AT-MSCs promovem alteração do ciclo celular dos linfócitos T CD3+

Houve alteração no ciclo celular dos linfócitos CD3+ avaliados, havendo uma redução do número de células na fase proliferativa do ciclo, fase S, nas co-culturas de AT-MSCs e PBMCs. Tanto nas situações em que houve contato direto quanto nas de contato indireto (transwell), essa redução foi evidenciada com significância ($p < 0,05$).

Em relação à apoptose, não foi possível estabelecer uma relação significativa com base nos valores encontrados. Os resultados das fases do ciclo celular, avaliados por citometria de fluxo, estão descritos nas figuras 4 e 5.

5.2 A ação das AT-MSCs não dependeu do contato direto com os linfócitos T CD3

As co-culturas feitas com presença das membranas transwell demonstraram inibição, mas que não foi estatisticamente relevante em relação às culturas de AT-MSCs com contato direto. Ainda assim, a inibição foi significativa em relação à cultura de PBMCs + ConA.

5.3 Contagem de linfócitos T CD3 ativados

Os grupos contendo PBMCs em co-cultura com as AT-MSCs não apresentaram redução na contagem de linfócitos T CD3+ em comparação aos grupos contendo somente PBMCs + ConA (PBMC+ConA: $p=0.11$; PBMC+ConA+transwell: $p=0.2$). Resultados estão expostos na figura 6.

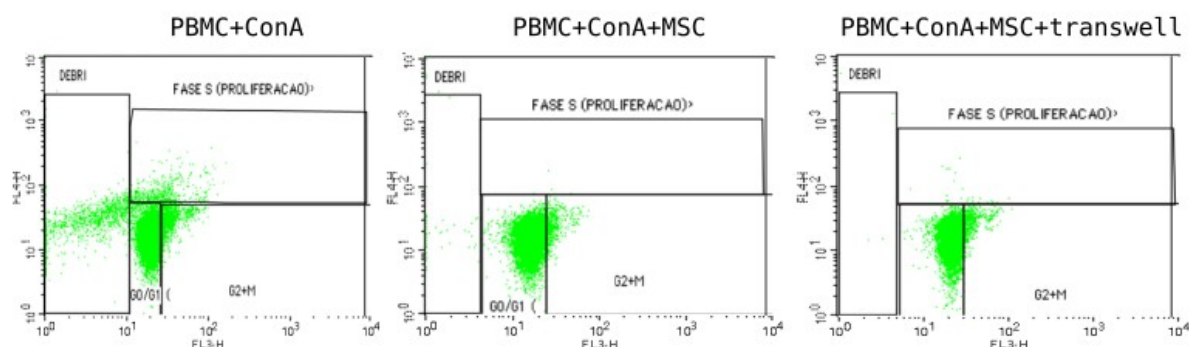


Figura 4: Citometria de fluxo PBMCs em co-cultura com uma das linhagens de AT-MSCs, demonstrando fases do ciclo celular de linfócitos T mantidos em cultura. Nota-se uma redução da Fase S (proliferativa) de linfócitos quando em co-cultura com MSCs. Todas as culturas continham o mitogênico Concanavalina A.

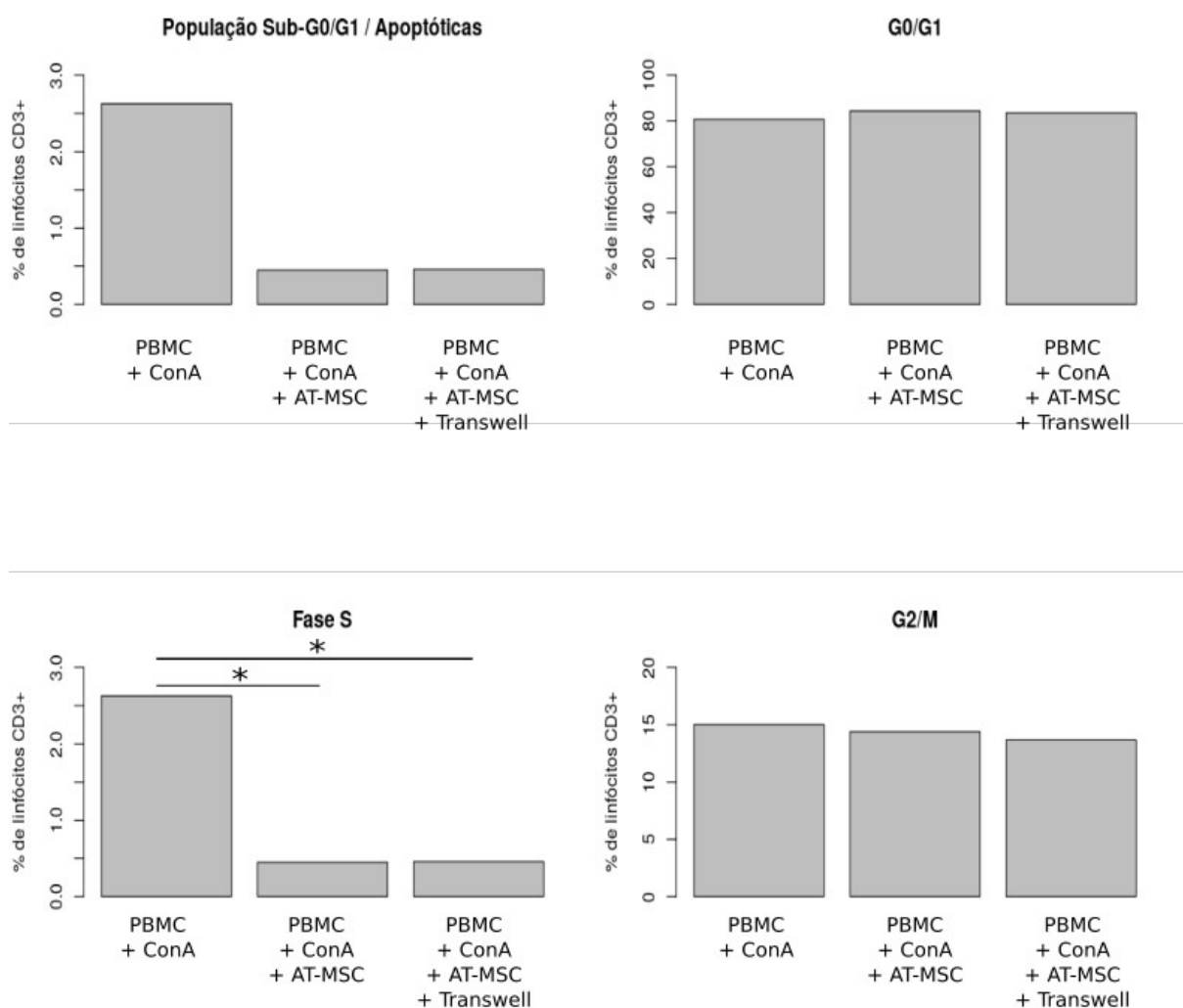


Figura 5: Fases do ciclo celular de linfócitos T CD3+ comparando as co-culturas com PBMCs e AT-MSCs em contato direto e indireto. * indica diferença estatística (p<0.05).

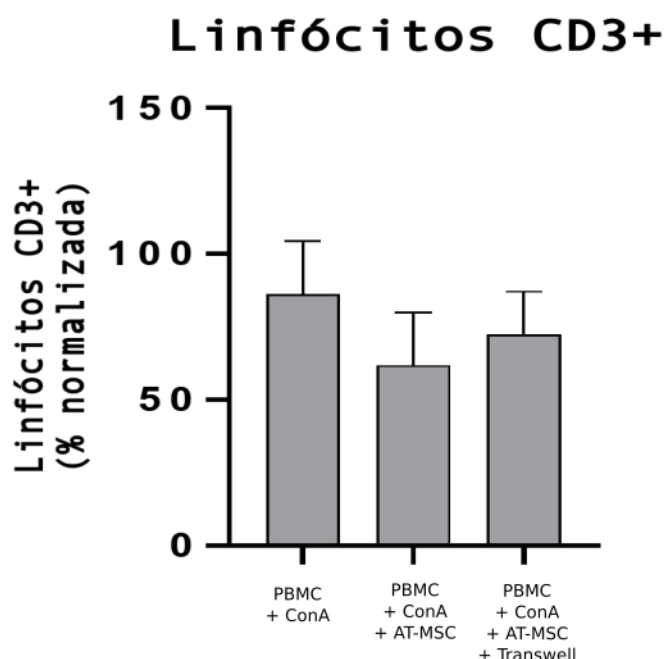


Figura 6: Médias e desvio padrão do número de linfócitos CD3+, normalizadas com base no grupo de PBMC+ConA.

6 DISCUSSÃO

As AT-MSCs têm propriedades imunomoduladoras e regenerativas que foram demonstradas em várias espécies animais. A modelagem de doenças induzidas para pesquisa, como a EAE, tem limitações significativas em relação à complexidade das características patológicas nativas da doença biológica. Isso provavelmente contribui para a alta taxa de falha de modelos de doenças de roedores em transição para ensaios clínicos de fase I em humanos (KOL et al., 2015). Portanto, doenças de animais de companhia que ocorrem naturalmente podem recapitular melhor as características complexas e heterogêneas associadas à patologia da doença humana. Dessa forma, a utilização da terapia MSC para o tratamento de distúrbios do SNC em cães tornou-se de grande interesse nos últimos anos (CLARK; AMADOR; WANG, 2023).

É descrito em literatura que as MSCs comumente inibem a proliferação de linfócitos in vitro. Amorim et al (2020) testaram esse potencial inibitório a partir de células derivadas de tecido adiposo e de placenta, com resultados que demonstraram redução da contagem total de linfócitos em ambos os casos. Taechangam et al. (2019) chegaram a resultados também significativos em MSCs de

felinos derivadas de tecido adiposo. Nosso trabalho não encontrou uma diferença estatística na contagem de linfócitos, porém, outros autores indicam que essa diferença não obrigatória. A atividade inibitória das MSCs é relativa à proporção de PBMCs e MSCs, mas também influenciada pelo tempo de co-cultura (LE BLANC et al., 2003). Como proposto por Kyurkchiev (2014), as MSCs podem realizar suas funções imunorreguladoras a partir dos estímulos recebidos. É possível inclusive que as MSCs estimulem a proliferação de linfócitos (LE BLANC et al., 2003), em alguns casos com reações consideradas explosivas (CROP et al., 2010).

Em relação à forma de ação, não depende exclusivamente do contato entre receptores celulares. Um dos mecanismos para exercer essas funções é a secreção de fatores solúveis que podem influenciar diretamente as células imunes efetoras; e outro é através de contato direto entre as células (AMORIM et al., 2020; BULATI et al., 2020). Porém, mesmo a dispersão de citocinas e fatores solúveis também tem certos limites de ação, e muitas vezes depende de um contato próximo, mesmo que indireto. O NO, por exemplo, pode levar 24h para ser detectado em culturas com transwell, o que representa o dobro do tempo em co-culturas com contato direto (SATO et al., 2006). Quando sozinhas, as MSCs produzem a NO em uma quantidade que pode não ser importante; mas, quando em contato com outras células e estimuladas por elas, como células T, que produzem iNOS, essa quantidade é elevada (SATO et al., 2006). Amorim et al. notaram diferença estatisticamente significativa na contagem de PBMCs em contato direto com MSCs e através de transwell. Nosso trabalho não encontrou diferença estatística entre os grupos, a exemplo de Di Nicola et al. (2002), que também não relataram diferença entre os grupos com e sem membrana transwell, apesar de ambos os casos terem diferença do grupo controle, sem MSCs.

A co-cultura com MSCs altera a fase do ciclo celular das PBMCs. Taechangam et al. (2019) encontraram uma redução na proliferação de linfócitos T devido à apreensão das células na fase G0-G1 do ciclo. Outrossim, não evidenciaram aumento de apoptose celular. Carrade et al. (2012) observaram a mesma situação com tecidos de equinos, ao comparar PBMCs com MSCs provenientes de tecido adiposo, medula óssea, cordão umbilical e sangue umbilical. Em todas as situações,

a proliferação de linfócitos T estimulados foi inibida. Outros trabalhos também evidenciaram a redução da contagem de células na Fase S do ciclo celular com consequente aumento em outras fases. Nosso trabalho encontrou alterações de aumento na fase G0/G1 e G2/M.

Considerando que os meios pelos quais essas alterações do ciclo ocorrem podem ser várias, ainda é necessário avaliar a relevância das citocinas e fatores solúveis secretados pelas MSCs para as alterações visualizadas no ciclo celular. Diferentes fontes celulares de diferentes espécies podem secretar mediadores químicos com diferentes importâncias. Bloquear alguns desses mediadores é uma forma de avaliar a relevância de cada um deles. E é preciso também quantificar esses mediadores com tempos de cultura variados também, a fim de elucidar suas importâncias em relação ao potencial inibitório das MSCs.

7 CONCLUSÃO

O teste de Reação Mista de Leucócitos mostrou-se ser uma ferramenta importante para investigar *in vitro* o potencial imunomodulador das MSCs, por meio da avaliação da capacidade de inibição da proliferação de linfócitos.

As AT-MSCs caninas induziram a redução da fase proliferativa (fase S do ciclo celular) de linfócitos CD3+, nas co-culturas com e sem contato direto.

Apesar de não termos observado diferença estatística, houve tendência de redução da proliferação de linfócitos CD3+ estimulados com concanavalina A quando em co-cultura direta e indireta com AT-MSCs.

Nossos resultados indicam que as AT-MSCs caninas apresentam potencial imunomodulador. Novos estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos de ação imunomoduladores das AT-MSCs caninas sobre linfócitos.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, L. H.; PILLAI, S. Immunologic tolerance and autoimmunity. Em: **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p. 326.

AL JUMAH, M. A.; ABUMAREE, M. H. The Immunomodulatory and Neuroprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE): A Model of Multiple Sclerosis (MS). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 9298–9331, jul. 2012.

AMORIM, R. M. et al. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 304, 22 jul. 2020.

ANAYA, J.-M. Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology). **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 11, p. 781–784, 1 set. 2012.

ANDERSON, P. et al. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Self-Reactive T Cell Responses and Dendritic Cell Function. **Stem Cells International**, v. 2017, p. e2389753, 30 jan. 2017.

BACH, J. F. Regulatory T cells under scrutiny. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 3, p. 189–198, 2003.

BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 392–402, 3 out. 2013.

BIKKER, A. et al. Interleukin-7: A key mediator in T cell-driven autoimmunity, inflammation, and tissue destruction. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 16, p. 2347–2356, 2012.

BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 180–190, 2012.

BULATI, M. et al. The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species. **Comparative Medicine**, v. 63, n. 3, p. 207–217, jun. 2013.

CHOI, S.; SCHWARTZ, R. H. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. **Seminars in Immunology**, Molecular Mechanisms Supporting Peripheral T cell Tolerance: Potential Therapeutic Approaches to Autoimmunity and Allograft Rejection. v. 19, n. 3, p. 140–152, 1 jun. 2007.

CIPRIANI, P. et al. Stem cells in autoimmune diseases: Implications for pathogenesis and future trends in therapy. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 7, p. 709–716, maio 2013.

CLARK, K. C.; AMADOR, A.; WANG, A. Convergence of human and veterinary medicine: leveraging canine naturally occurring neurological disorders to develop regenerative treatments. **Neural Regeneration Research**, v. 18, n. 3, p. 541–542, mar. 2023.

CROP, M. J. et al. Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Explosive T-Cell Proliferation. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 12, p. 1843–1853, dez. 2010.

DAI, C. et al. Hepatocyte growth factor preserves beta cell mass and mitigates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 27080–27087, 18 jul. 2003.

DE WOLF, C.; VAN DE BOVENKAMP, M.; HOEFNAGEL, M. Regulatory perspective on in vitro potency assays for human mesenchymal stromal cells used in immunotherapy. **Cytotherapy**, v. 19, n. 7, p. 784–797, jul. 2017.

DELAROSA, O.; DALEMANS, W.; LOMBARDO, E. Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 182, 2012.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 15 set. 2015.

DI IANNI, M. et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 3, p. 309–318, mar. 2008.

DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838–3843, 15 maio 2002.

DOMBROWSKI, Y. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 674–680, maio 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DU, W. et al. Tim-3 as a target for cancer immunotherapy and mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

ERKERS, T. et al. Decidual stromal cells promote regulatory T cells and suppress alloreactivity in a cell contact-dependent manner. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 19, p. 2596–2605, 1 out. 2013.

FRIESE, M. A.; SCHATTLING, B.; FUGGER, L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 4, p. 225–238, abr. 2014.

FURTADO, G. C. et al. Swift Entry of Myelin-Specific T Lymphocytes into the Central Nervous System in Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 4648–4655, 1 out. 2008.

GARCÍA-GONZÁLEZ, P. et al. Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 11, p. 1071–1080, nov. 2016.

GLENNIE, S. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2821–2827, 1 abr. 2005.

GOLDBERG, M. V.; DRAKE, C. G. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. Em: DRANOFF, G. (Ed.). **Cancer Immunology and Immunotherapy**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 269–278.

GONZALEZ-PUJANA, A. et al. Multifunctional biomimetic hydrogel systems to boost the immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells. **Biomaterials**, v. 257, p. 120266, out. 2020.

GREER, K. A. et al. Necrotizing meningoencephalitis of Pug dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 2, p. 110–118, ago. 2010.

GU, Y. et al. Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. **Human Immunology**, v. 74, n. 3, p. 267–276, mar. 2013.

HOFFMAN, A. M.; DOW, S. W. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 34, n. 7, p. 1709–1729, jul. 2016.

HSU, W.-T. et al. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- γ +CD4⁺ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 190, n. 5, p. 2372–2380, 1 mar. 2013.

JIANG, W.; XU, J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 1, p. e12712, 2020.

KAMRADT, T.; MITCHISON, N. A. Tolerance and Autoimmunity. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 9, p. 655–664, 1 mar. 2001.

KANG, J. W. et al. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 4, p. 681–693, ago. 2008.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 709–716, 14 jun. 2012.

KHAN, U. et al. Immunotherapy-associated autoimmune hemolytic anemia. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, 2017.

KHAN, U.; GHAZANFAR, H. Chapter Three - T Lymphocytes and Autoimmunity. Em: GALLUZZI, L.; RUDQVIST, N.-P. (Eds.). **International Review of Cell and Molecular Biology**. Biology of T Cells - Part A. [s.l.] Academic Press, 2018. v. 341p. 125–168.

KODA, M. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Suppresses Delayed Apoptosis of Oligodendrocytes after Spinal Cord Injury in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 19, n. 6, p. 777–785, jun. 2002.

KOL, A. et al. Companion animals: Translational scientist's new best friends. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 308, p. 308ps21-308ps21, 7 out. 2015.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, mar. 2013.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KRAMPERA, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3722–3729, 1 maio 2003.

KRAMPERA, M. et al. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 435–441, ago. 2006.

KUEHN, H. S. et al. FAS Haploinsufficiency Is a Common Disease Mechanism in the Human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 6035–6043, 15 maio 2011.

KYURKCHIEV, D. et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 552–570, 26 nov. 2014.

LAFFERTY, K.; CUNNINGHAM, A. A New Analysis of Allogeneic Interactions. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 53, n. 1, p. 27–42, 1975.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, n. 1, p. 11–20, jan. 2003.

LEACH, D. R.; KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1734–1736, 1996.

LEJKOWSKA, R. et al. Preclinical Evaluation of Long-Term Neuroprotective Effects of BDNF-Engineered Mesenchymal Stromal Cells as Intravitreal Therapy for Chronic Retinal Degeneration in Rd6 Mutant Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 777, jan. 2019.

LI, S. et al. A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, n. 4, p. 326–331, jul. 2014.

LIAO, W.; LIN, J.-X.; LEONARD, W. J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 13–25, 24 jan. 2013.

LIN, R. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells favor the immunosuppressive T cells skewing in a *Helicobacter pylori* model of gastric cancer. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 21, p. 2836–2848, 1 nov. 2013.

LINKER, R. A. et al. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. **Brain**, v. 133, n. 8, p. 2248–2263, 1 ago. 2010.

MAETA, N. et al. Comparative analysis of canine mesenchymal stem cells and bone marrow-derived mononuclear cells. **Veterinary World**, v. 14, n. 4, p. 1028–1037, abr. 2021.

MAHMOOD, A.; LU, D.; CHOPP, M. Intravenous Administration of Marrow Stromal Cells (MSCs) Increases the Expression of Growth Factors in Rat Brain after Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 33–39, jan. 2004.

MAKI, C. B. et al. Intra-articular Administration of Allogeneic Adipose Derived MSCs Reduces Pain and Lameness in Dogs With Hip Osteoarthritis: A Double Blinded, Randomized, Placebo Controlled Pilot Study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 2020.

MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 3, p. 347–356, set. 2011.

MANCHES, O. et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase–dependent mechanism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3431–3439, 1 out. 2008.

MANSOOR, S. R.; ZABIHI, E.; GHASEMI-KASMAN, M. The potential use of mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis. **Life Sciences**, v. 235, p. 116830, 15 out. 2019.

MARKUS, A.; PATEL, T. D.; SNIDER, W. D. Neurotrophic factors and axonal growth. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 5, p. 523–531, out. 2002.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 221–241, 2012.

MEISEL, R. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619–4621, 15 jun. 2004.

MELIEF, S. M. et al. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 2, n. 6, p. 455–463, jun. 2013.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762–774, out. 2004.

MIYARA, M.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 9, p. 543–551, set. 2014.

MIZUNO, K. et al. Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 194, n. 1, p. 178–186, 15 jul. 1993.

MIZUNO, S.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. HGF as a renotrophic and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 13, p. 7072–7086, 1 maio 2008.

MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 6, p. 1895–1905, jun. 2005.

MUNN, D. H. et al. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 633–642, 1 maio 2005.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 3, p. 137–143, 1 mar. 2013.

NAJAR, M. et al. Immune-Related Antigens, Surface Molecules and Regulatory Factors in Human-Derived Mesenchymal Stromal Cells: The Expression and Impact of Inflammatory Priming. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 4, p. 1188–1198, 1 dez. 2012.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 160–171, fev. 2016.

NAKAMURA, T.; MIZUNO, S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 86, n. 6, p. 588–610, 11 jun. 2010.

NAKANISHI, M.; ROSENBERG, D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 2, p. 123–137, 1 mar. 2013.

NGUYEN, T. M. et al. EphB and Ephrin-B interactions mediate human mesenchymal stem cell suppression of activated T-cells. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 20, p. 2751–2764, 15 out. 2013.

NICOTRA, T. et al. Mesenchymal stem/stromal cell quality control: validation of mixed lymphocyte reaction assay using flow cytometry according to ICH Q2(R1). **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 426, 1 out. 2020.

ODINAK, M. M. et al. [Transplantation of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis]. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S Korsakova**, v. 111, n. 2 Pt 2, p. 72–76, 1 jan. 2011.

OHMACHI, H.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. **The American Journal of Physiology**, v. 270, n. 6 Pt 1, p. L1031-1039, jun. 1996.

PACHLER, K. et al. An In Vitro Potency Assay for Monitoring the Immunomodulatory Potential of Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1413, 1 jul. 2017.

PARK, E.-S.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Th1-, Th2-, and Th17-related cytokine and chemokine receptor mRNA and protein expression in the brain tissues, T cells, and macrophages of dogs with necrotizing and granulomatous meningoencephalitis. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1127–1134, nov. 2013.

PARR, A. M.; TATOR, C. H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, n. 7, p. 609–619, out. 2007.

PAUL, G.; ANISIMOV, S. V. The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2246–2256, dez. 2013.

PÉREZ-MERINO, E. M. et al. Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 206, n. 3, p. 391–397, dez. 2015.

PETCHDEE, S.; SOMPEEWONG, S. Intravenous administration of puppy deciduous teeth stem cells in degenerative valve disease. **Veterinary World**, v. 9, n. 12, p. 1429–1434, dez. 2016.

PICCIRILLO, C. A.; THORNTON, A. M. Cornerstone of peripheral tolerance: Naturally occurring CD4 +CD25+ regulatory T cells. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 7, p. 374–380, 2004.

PLUMAS, J. et al. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. **Leukemia**, v. 19, n. 9, p. 1597–1604, set. 2005.

RAMASAMY, R. et al. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function.

Cellular Immunology, v. 251, n. 2, p. 131–136, fev. 2008.

RONCAROLO, M. G. et al. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: Natural mechanisms and therapeutic applications.

Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 380, p. 39–68, 2014.

SATO, K. et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells.

Blood, v. 109, n. 1, p. 228–234, 19 set. 2006.

SCHMASSMANN, A. et al. Roles of hepatocyte growth factor and its receptor Met during gastric ulcer healing in rats.

Gastroenterology, v. 113, n. 6, p. 1858–1872, dez. 1997.

SCHORL, C.; SEDIVY, J. M. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells.

Methods, Methods in Cell Cycle Research. v. 41, n. 2, p. 143–150, 1 fev. 2007.

SCHWARTZ, R. H. Historical Overview of Immunological Tolerance.

Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 4, n. 4, p. a006908, 4 jan. 2012.

SGRIGNOLI, M. R. et al. Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF α in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells.

Stem cell research, v. 39, p. 101525, 1 ago. 2019.

SOLCHAGA, L. A.; ZALE, E. A. Prostaglandin E2: a putative potency indicator of the immunosuppressive activity of human mesenchymal stem cells.

American Journal of Stem Cells, v. 1, n. 2, p. 138–145, 30 jun. 2012.

TAJIMA, H. et al. Tissue distribution of hepatocyte growth factor receptor and its exclusive down-regulation in a regenerating organ after injury.

Journal of Biochemistry, v. 111, n. 3, p. 401–406, mar. 1992.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. Targeting interleukin-6: All the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1227–1236, 2012.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–736, set. 2008.

VAN VELTHOVEN, C. T. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Transplantation Attenuates Brain Injury After Neonatal Stroke. **Stroke**, v. 44, n. 5, p. 1426–1432, maio 2013.

VIEIRA-POTTER, V. J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1484–1492, out. 2014.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523–532, jul. 2008.

VILLATORO, A. J. et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. **The Veterinary Record**, v. 183, n. 21, p. 654, 1 dez. 2018.

VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 21, n. 3, p. 382–394, maio 2013.

WANG, L.; ZHAO, Y.; SHI, S. Interplay between Mesenchymal Stem Cells and Lymphocytes: Implications for Immunotherapy and Tissue Regeneration. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 11, p. 1003–1010, 1 nov. 2012.

WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1009–1016, nov. 2014.

WANG, Z. et al. Safety of neural stem cell transplantation in patients with severe traumatic brain injury. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 6, p. 3613–3618, 1 jun. 2017.

WATANABE, N. et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nature Immunology**, v. 4, n. 7, p. 670–679, 2003.

YAMOUT, B. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 227, n. 1–2, p. 185–189, 8 out. 2010.

YANG, L. et al. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4409–4414, 2008.

YEUNG, R. S. M. et al. Enhancing translational research in paediatric rheumatology through standardization. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 11, p. 684–690, nov. 2016.

YOSHIDA, S. et al. Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 2, p. 335–343, fev. 2003.

ZHANG, J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 1, p. 16–26, 1 set. 2005.

ZHANG, Q.; VIGNALI, D. A. A. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 1034–1051, 17 maio 2016.

ZHAO, Q.; CHEN, G. Role of IL-33 and its receptor in T cell-mediated autoimmune diseases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ZEIRA, O. et al. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 181, 29 set. 2015.

9 ANEXOS

9.1 TABELA DE LEITURAS DE BRDU-APC OBTIDAS EM CITOMETRIA DE FLUXO

	Grupo	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Contagem de Linfócitos CD3+	PBMC	43,24%	19,34%	42,85%	22,03%
	PBMC+ ConA	49,55%	32,58%	49,99%	36,75%
	PBMC+ ConA+ MSC	40,80%	19,48%	31,97%	29,10%
	PBMC+ ConA+ MSC+ Transwell	46,16%	30,88%	32,47%	32,64%
Fase G0/G1	PBMC	81,33%	76,28%	77,84%	89,31%
	PBMC+ ConA	73,43%	86,69%	80,54%	82,53%
	PBMC+ ConA+ MSC	70,28%	85,19%	90,60%	91,67%
	PBMC+ ConA+ MSC+ Transwell	69,90%	86,53%	94,83%	83,08%
Apoptose + Debris Celulares	PBMC	5,46%	10,08%	2,18%	0,37%
	PBMC+ ConA	2,58%	1,79%	2,18%	0,37%
	PBMC+	0,29%	0,77%	0,03%	0,57%

	ConA+ MSC				
	PBMC+ ConA+ MSC+ Transwell	1,25%	1,50%	0,29%	0,88%
Fase S	PBMC	3,02%	0,94%	2,35%	3,28%
	PBMC+ ConA	2,07%	1,73%	2,46%	4,25%
	PBMC+ ConA+ MSC	1,19%	0,21%	0,26%	0,14%
	PBMC+ ConA+ MSC+ Transwell	1,24%	0,10%	0,03%	0,47%
Fase G2/M	PBMC	10,20%	13,12%	16,77%	7,19%
	PBMC+ ConA	26,00%	10,45%	11,27%	12,39%
	PBMC+ ConA+ MSC	26,88%	15,47%	8,28%	6,94%
	PBMC+ ConA+ MSC+ Transwell	26,44%	11,45%	6,04%	10,73%

9.2 ANEXO II – ATESTADO DE APROVAÇÃO NA CEUA – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



ATESTADO

Atesto que o Projeto "POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS IN VITRO PELAS CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS DE DIFERENTES FONTES TECIDUAIS" **Protocolo CEUA 0105/2022**, a ser conduzido por Diego Petrocino Caetano, responsável/orientador Rogério Martins Amorim, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	16/05/2022 a 01/11/2022
Nome Comum/ Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Tutores voluntários

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 11/05/2022

JULIANY GOMES QUITZAN

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista “International Journal of Stem Cells”

Inhibition Potential Of Lymphocyte Proliferation In Vitro By Canine Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue

Diego Petrocino Caetano¹, Vinícius Skau Perino¹, Aline Márcia Marques Braz²,
Márjorie de Assis Golim², Marco Antonio Rodrigues Fernandes³,
Rogério Martins Amorim¹

¹Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science,
São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

²Clinical Hospital Research Center, Applied Biotechnology Laboratory, São Paulo
State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

³Department of Infectology, Dermatology, Diagnostic Imaging and Radiotherapy, São
Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Correspondence to Rogério Martins Amorim

Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and
Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Prof
Doutor Walter Mauricio Correia Street, UNESP Campus de
Botucatu, 18618-681-Botucatu, SP, Brazil

Tel: +55-14-38802082

E-mail: rogerio.amorim@unesp.br

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy has been shown to be a promising biotechnology in regenerative medicine, mainly due to its immunomodulatory potential. Its action occurs through several mechanisms, such as secretion of soluble factors and direct interaction between cells. Among the various interactions, the reduction of T lymphocyte proliferation is fundamental for the control of autoimmune diseases in general. Among the ways to evaluate the immunomodulatory potential of MSCs in vitro, the mixed leukocyte reaction test (MLR) is one of the most important, which evaluates the inhibition of leukocyte proliferation, particularly lymphocytes. The aim of this study was to evaluate in vitro the cell cycle and proliferation inhibition potential of lymphocytes stimulated with concanavalin A, when in co-culture (in direct and indirect contact) with canine adipose tissue-derived MSCs (AT-MSCs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). For this purpose, MLR tests were performed using PBMCs from clinically healthy donor dogs obtained through separation gradient with Histopaque 1077, in co-culture with canine AT-MSCs (n=4). Cultures were performed in duplicates of PBMCs (10^6 cells per well), PBMCs stimulated with concanavalin A (10^6 cells + 5ug/ml ConA), PBMCs stimulated with concanavalin A in direct co-culture with AT-MSCs (10^6 PBMCs + 5ug/ mL of ConA + 2×10^5 AT-MSCs), and PBMCs stimulated with concanavalin A in indirect co-culture (transwell membranes) with AT-MSCs (10^6 PBMCs + 5ug/mL of ConA + 2×10^5 AT-MSCs). The plates were kept in culture for 96h, with BrdU being added in the last 24h. Then, culture samples were incubated with anti-CD3 canine, anti-BrdU and 7-AAD antibodies for evaluation in flow cytometry. Canine AT-MSCs in co-culture with PBMCs induced a reduction in the proliferative phase of CD3+ lymphocytes, possibly shifting them to the G0/G1 phase of the cell cycle. The reduction in the proliferative phase of CD3+ lymphocytes was evidenced both in co-cultures of AT-MSCs and PBMCs with direct and indirect contact, indicating that the mechanisms of action also depend on chemical mediators secreted in the medium. Although we did not observe any statistical difference, there was a tendency to inhibit the proliferation of CD3+ lymphocytes stimulated with concanavalin A when in direct and indirect contact with AT-MSCs. Our results indicate that canine AT-MSCs have immunomodulatory

potential. New studies must be carried out to elucidate the immunomodulatory mechanisms of action of canine AT-MSCs on lymphocytes.

Keywords: PBMC, mixed lymphocyte reaction, autoimmune, regeneration

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs), also known as mesenchymal stromal cells, are fusiform cells capable of differentiating into different lineages of specialized cells, such as chondrocytes, osteoblasts and adipocytes, and of self-renewal [6]. These cells are derived from various adult tissues [15], attach to plastic tissue culture plates, and express certain cell surface markers. It has been shown that MSCs also represent a cell type to prevent overstimulation of the immune system [14].

Immune-mediated diseases are characteristically chronic and often incurable, representing a challenge for medical routine. Neuroimmune diseases are particularly difficult to obtain expressive results, both in humans and animals. Several mechanisms are involved in its pathogenesis, and of these, the activation of T Lymphocytes against self antigens is one of the most studied [8]. At this point, cell therapy with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) has proven to be a viable alternative treatment, but there are still many points to be clarified about its activities. MSCs regulate many types of immune cells through the immune modulators expressed by them [11]. The immunosuppressive activities of MSCs are mainly stimulated by pro-inflammatory factors such as IFN- γ (interferon gamma), TNF- α (tumor necrosis factor alpha) and IL-1 β (interleukin-1 beta) [2; FIBBE, 2013].

While direct cell contact is important for the immunosuppressive effects of MSCs, studies have shown that immune modulators expressed by MSCs are more critical, including indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), transforming growth factor beta (TGF- β), interleukin-10 (IL-10), hepatocyte growth factor (HGF), histocompatibility-G locus antigen (HLA-G), CD39 and CD73, galectins, C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), programmed cell death ligands 1 and 2 (PD-L1 and PD-L2), heme oxygenase 1 (HO-1), tumor necrosis factor-stimulated gene 6 (TSG6), interleukin-1 receptor antagonist (IL1RA) and factor related to the complement system [7].

In this work, we evaluate the in vitro potential of canine MSCs derived from adipose tissue (AT-MSC) to inhibit the proliferation of CD3⁺ lymphocytes, evaluating through flow cytometry the changes in the cell cycle of lymphocytes in co-culture with MSCs, as well as T Cell total count.

MATERIALS AND METHODS

The project was submitted and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA/FMVZ - Protocol 0105/2022), and carried out in the laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics of the Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu campus - Sao Paulo. Mesenchymal stem cells from adipose tissue (adipose tissue derived mesenchymal stem cells – AT-MSc), previously characterized and stored in a cell bank of our research group, were used. For the Mixed Leukocyte Reaction test, leukocytes from blood samples from healthy dogs were used, distributed in up to five samples of 10mL each, for each donor, whose guardians have agreed and signed the free and informed consent form.

AT-MSc samples

Samples of AT-MSCs from a cell bank already consolidated at UNESP-Botucatu by the team of researchers led by Professor Rogério Martins Amorim were used. Cells are maintained in culture medium containing 88% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin. The cultured cells had their multipotentiality previously proven with the induction for in vitro differentiation in the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages, following the manufacturers' recommendations. The cells were also previously evaluated for the CD surface antigen profile through flow cytometry using the following markers: CD34, CD45, CD44, CD90, and MHC-II.

Fourth passage samples of AT-MSCs obtained from the cell bank were used. These samples were thawed and cultured for 24 hours. After this period, they were irradiated in a cobalt bomb for 75 minutes, totaling a dose of 2.5Gy, to prevent them from proliferating during the experiment. Cells were kept in culture medium until plating, which occurred in 12 hours.

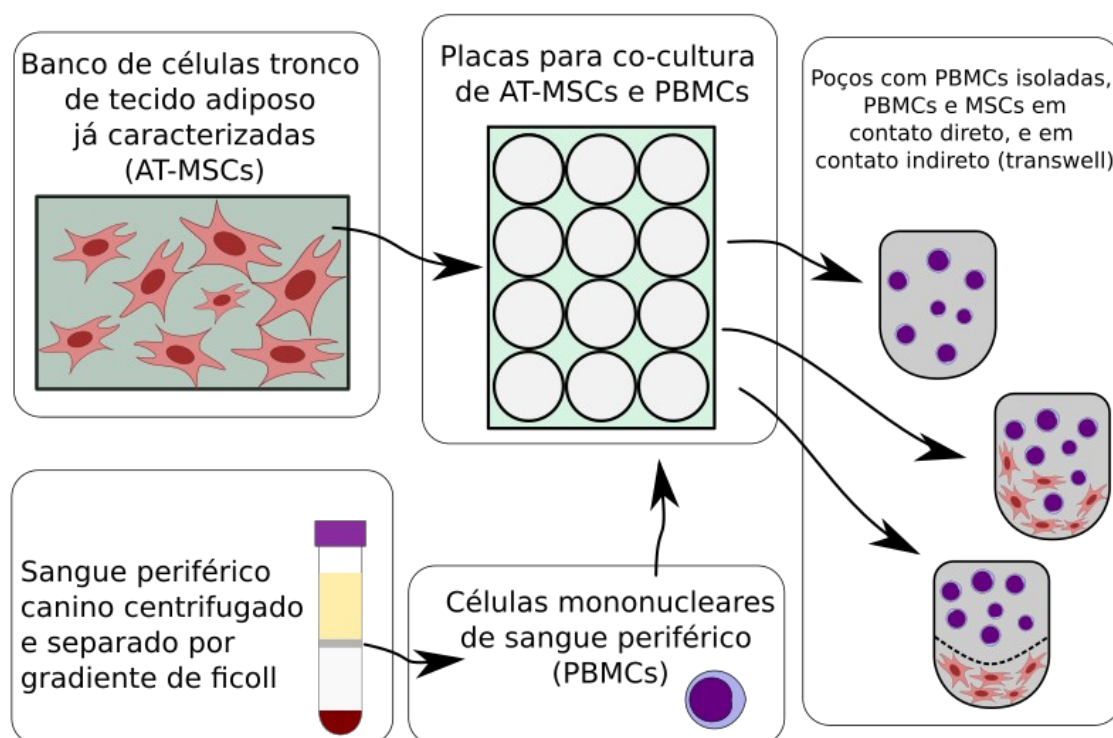


Fig. 1: MLR test. Lymphocytes from healthy dogs were plated with AT-MSCs from a previously characterized cell bank, with and without direct contact.

PBMC samples

Samples of 10mL of peripheral blood were collected from five donor dogs weighing at least 15kg by venojugular puncture in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The time between collection and processing was a maximum of 2 hours for all samples. The donors' guardians signed a Free and Informed Consent Form. After collection, the samples were individually diluted in DPBS at a 1:1 ratio, and carefully deposited on a 10mL column of Histopaque 1077. Then they were centrifuged at 700g for 30min in a refrigerated centrifuge with slow deceleration. The layer of PBMCs that formed above the Histopaque 1077, as shown in Fig. 1, was collected and washed three times by resuspension in 1mL of DPBS and centrifugation at 300g for 10min, also with slow deceleration. An aliquot of 50uL of the resulting PBMCs was taken for automated counting, and the cells were maintained in culture medium and stored on ice until plating, which occurred in 2h.

Mixed Leukocyte Reaction Test (MLR)

The mixed lymphocyte reaction (MLR) assay was performed, with results evaluated by flow cytometry, based on the description by Amorim et. al (2020). The assay was performed four times, identically, but with AT-MSCs and PBMCs from different donors.

Despite the objective being to evaluate the population of CD3⁺ T lymphocytes, the interaction of these cells with other mononuclear cells is of great importance. Thus, it was decided to use PBMCs and not just lymphocytes. As shown in Fig. 1, canine MSCs were plated in co-culture with PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) in the ratio MSC:PBMC 1:5. 200,000 MSCs and 10⁶ PBMCs were used per well, with a medium volume of 1.5 mL. Wells were prepared in four different situations, as shown in Table 1: Isolated PBMCs; PBMCs with Concanavalin A (ConA); PBMC and MSCs in direct contact; and PBMCs and MSCs without direct contact, separated by transwell plates, as shown in Fig. 1. All samples were made in duplicates. The concentration of Concanavalin A used was 5 µg/mL. After 3 days in co-culture, the wells were treated with 1 mM bromodeoxyuridine (BrdU, BD Biosciences), and then maintained in culture for another 24 hours. All samples were labeled with anti-BrdU antibodies labeled with fluorochrome APC and 7-AAD (BrdU FlowKit, BD Biosciences), exactly according to the manufacturer's instructions; and also with anti-canine antibody CD3 conjugated with FITC (CD3e Monoclonal Antibody (CA17.2A12), ThermoFisher Scientific). Samples were then analyzed on a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Company). Cultures of PBMCs that underwent the same treatment were also maintained, including the use of BrdU, but without the addition of antibodies at the end, to control autofluorescence in cytometry.

Statistical analysis

Data analysis was carried out in the R programming language. The experiments were carried out with a total n = 4, each sample being taken in duplicate and considering the average of the duplicates for statistics. Statistical significance between two groups was determined by the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test. P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The cytometry test was used to assess cell proliferation. Lymphocytes were analyzed for proliferation index (Phase S), with less proliferation in co-cultures with MSCs and MSCs in transwell wells. The averages of the results obtained, which were performed in duplicates, are shown in the table in ANNEX I.

MSCs promote changes in the cell cycle of CD3+ T lymphocytes

There was alteration in the cell cycle of the evaluated CD3+ lymphocytes, with a reduction in the proliferative phase of the cycle, phase S, in the co-cultures of MSCs and PBMCs. Both in situations where there was direct contact and in those with indirect contact (transwell), this reduction was significantly evidenced ($p < 0.05$).

Regarding apoptosis, it was not possible to establish a significant relationship based on the values found. The results of the cell cycle phases, evaluated by flow cytometry, are described in figures 3 and 4.

The action of MSCs depends partially on direct contact with CD3 T lymphocytes

Co-cultures made with the presence of transwell membranes showed inhibition, but which was not statistically relevant in relation to cultures of MSCs with direct contact. Even so, the inhibition was significant in relation to the culture of PBMCs + ConA.

Activated CD3 T lymphocyte count

The groups containing PBMCs in co-culture with the MSCs showed a reduction in the CD3+ T lymphocyte count compared to the groups containing only PBMCs + ConA, but this reduction was not statistically significant (PBMC+ConA: $p = 0.11$; PBMC+ConA+transwell : $p = 0.2$). Results are shown in figure 5.

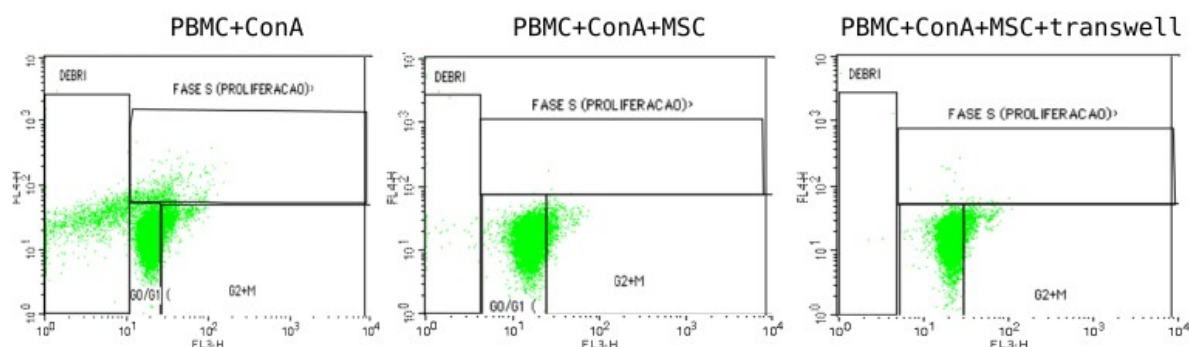


Fig. 3: Flow cytometry PBMCs in co-culture with one of the MSCs strains, demonstrating cell cycle phases of T lymphocytes maintained in culture. A reduction in S Phase (proliferative) lymphocytes is noted when co-cultured with MSCs. All cultures contained the mitogen Concanavalin A.

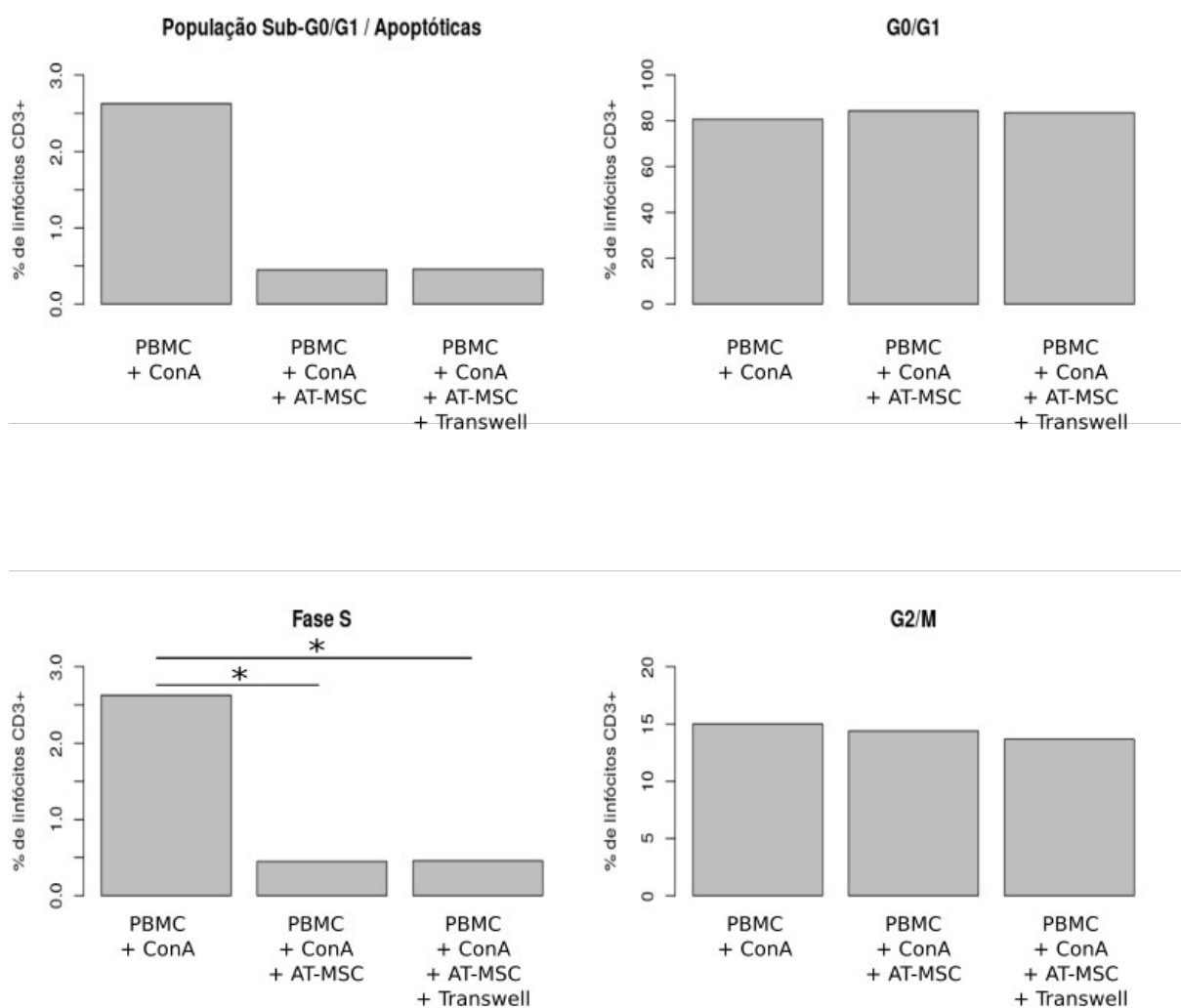


Fig. 4: Cell cycle phases comparing co-cultures with PBMCs and MSCs in direct and indirect contact. The graphs show normalized proportions in relation to the culture without MSCs (only PBMCs and

ConA). A: Debris + cellular apoptosis; B: S (proliferative) phase of the cell cycle; C: Phase G0/G1; D: Phase G2/M. * indicates statistical difference ($p < 0.05$).

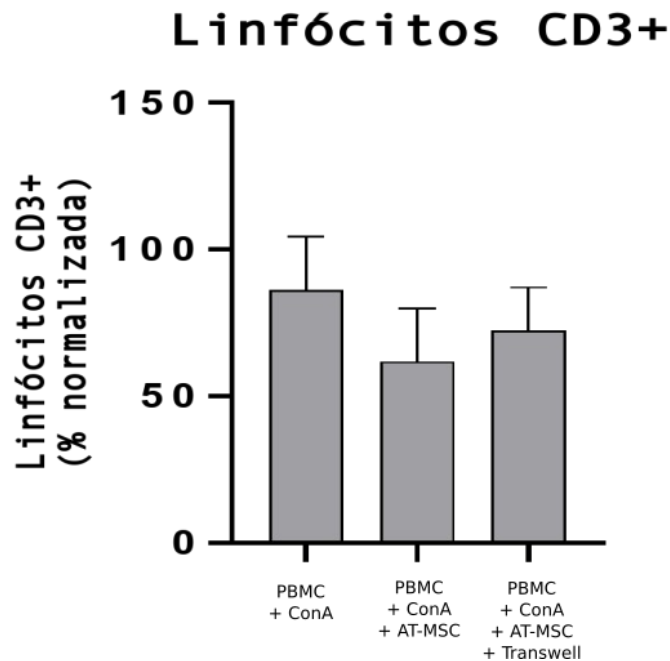


Fig. 5: Means and standard deviation of lymphocyte T CD3+ counts by flow cytometry, normalized based on culture counts of PBMCs.

DISCUSSION

MSCs have immunomodulatory and regenerative properties that have been demonstrated in several animal species. Modeling of research-induced diseases such as EAE has significant limitations with respect to the complexity of the native pathological features of the biological disease. This likely contributes to the high failure rate of rodent disease models transitioning to human phase I clinical trials [9]. Therefore, naturally occurring companion animal diseases may better recapitulate the complex and heterogeneous features associated with the pathology of human disease. Thus, the use of MSC therapy for the treatment of CNS disorders in dogs has become of great interest in recent years [5].

As proposed by Kyurkchiev (2014), MSCs can perform their immunoregulatory functions from different stimuli. One of the mechanisms to exert these functions is the secretion of soluble factors that can directly influence effector immune cells; and another is through direct contact between cells [1, 3]. The work demonstrated a reduction of cells in Phase S of cell proliferation (Fig. 3 and 4).

Amorim et al. (2020), in a similar work, noted that MSCs inhibit the proliferation of T lymphocytes when in contact with PBMCs, however, they found a statistically significant difference between the groups with and without the transwell membrane. Even so, even when separated by the membrane and without direct contact, there was inhibition of the proliferation of PBMCs. Our work found similar values in both situations. Another point observed by the same author is that the reduction in the proliferation of T lymphocytes is due to an arrest of cells in the G0-G1 phase of the cell cycle, and not to an increase in apoptosis of PBMCs.

Taechangam et al. (2019) carried out similar work, but with feline PBMCs and MSCs. They found a reduction in T lymphocyte proliferation due to cell seizure in the G0-G1 phase of the cycle. Furthermore, they did not show an increase in cellular apoptosis. Carrade et al. (2012) observed the same situation with equine tissues, when comparing PBMCs with MSCs from adipose tissue, bone marrow, umbilical cord and umbilical blood. In all situations, the proliferation of stimulated T lymphocytes was inhibited.

Regarding the form of action, the difference between wells with and without transwell can be explained not only by the absence of direct contact. Dispersion of cytokines and soluble factors also has certain limits of action, and often depends on close contact, even if indirect. NO, for example, can take 24h to be detected in cultures with transwell, which represents twice as long in co-cultures with direct contact [SATO et al., 2006].

The means by which this alteration of the cycle occurs can be several. The importance of the different factors secreted by cells is undeniable, but also their direct contact. More studies are needed in order to elucidate which pathways are most important, and what is the relevance of each one of them.

CONCLUSION

The Mixed Leukocyte Reaction test proved to be an important tool to investigate in vitro the immunomodulatory potential of MSCs, through the evaluation of the ability to inhibit lymphocyte proliferation.

Canine AT-MSCs induced a reduction in the proliferative phase (S phase of the cell cycle) of CD3+ lymphocytes, in co-cultures with and without direct contact.

Although we did not observe any statistical difference, there was a tendency towards a reduction in the proliferation of CD3+ lymphocytes stimulated with concanavalin A when in direct and indirect co-culture with AT-MSCs.

Our results indicate that canine AT-MSCs have immunomodulatory potential. New studies must be carried out to elucidate the immunomodulatory mechanisms of action of canine AT-MSCs on lymphocytes.

Data Availability Statement

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Author Disclosure Statement

The authors declare no potential conflicts of interest.

Funding Information

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

1. Amorim, R.M., Clark, K.C., Walker, N.J., Kumar, P., Herout, K., Borjesson, D.L., Wang, A., 2020. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. *Stem Cell Res Ther* 11, 304. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01799-0>
2. Bernardo, M.E., Fibbe, W.E., 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
3. Bulati, M., Miceli, V., Gallo, A., Amico, G., Carcione, C., Pampalone, M., Conaldi, P.G., 2020. The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. *Frontiers in Immunology* 11.
4. Carrade, D.D., Borjesson, D.L., 2013. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species. *Comp Med* 63, 207–217.
5. Clark, K.C., Amador, A., Wang, A., 2023. Convergence of human and veterinary medicine: leveraging canine naturally occurring neurological disorders to develop regenerative treatments. *Neural Regeneration Research* 18, 541–542. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.350195>
6. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
7. Jiang, W., Xu, J., 2020. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation* 53, e12712. <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
8. Khan, U., Ghazanfar, H., 2018. Chapter Three - T Lymphocytes and Autoimmunity, in: Galluzzi, L., Rudqvist, N.-P. (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology, Biology of T Cells - Part A*. Academic Press, pp. 125–168. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.008>
9. Kol, A., Arzi, B., Athanasiou, K.A., Farmer, D.L., Nolte, J.A., Rebhun, R.B., Chen, X., Griffiths, L.G., Verstraete, F.J.M., Murphy, C.J., Borjesson, D.L., 2015. Companion animals: Translational scientist's new best friends. *Science Translational Medicine* 7, 308ps21-308ps21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9116>

10. Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemmezova, K., Kyurkchiev, S., 2014. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 6, 552–570. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>
11. Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., Bron, D., Tounouz, M., Lagneaux, L., 2016. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 18, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.011>
12. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K., 2006. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228–234. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>
13. Taechangam, N., Iyer, S.S., Walker, N.J., Arzi, B., Borjesson, D.L., 2019. Mechanisms utilized by feline adipose-derived mesenchymal stem cells to inhibit T lymphocyte proliferation. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 188. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1300-3>
14. Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
15. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., Shi, Y., 2014. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 15, 1009–1016. <https://doi.org/10.1038/ni.3002>