

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**Avaliação do Potencial Imunomodulador de células-
tronco mesenquimais isoladas a partir de polpa
dental, tecido adiposo e medula óssea.**

FELIPE VALLE FORTES RODRIGUES

Porto Alegre
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**Avaliação do Potencial Imunomodulador de células-tronco
mesenquimais isoladas a partir de polpa dental, tecido
adiposo e medula óssea.**

FELIPE VALLE FORTES RODRIGUES

Orientador: Prof^ª. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Co-orientador: Prof^ª Dra. Bruna Amorin

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre
2015

CIP - Catalogação na Publicação

Valle Fortes Rodrigues, Felipe

Avaliação do Potencial Imunomodulador de células-tronco mesenquimais isoladas a partir de polpa dental, tecido adiposo e medula óssea. / Felipe Valle Fortes Rodrigues. -- 2015.

74 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Coorientadora: Bruna Amorin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Célula-tronco mesenquimal. 2. Lisado Plaquetário. 3. Imunomodulação. 4. Polpa Dentária. 5. Tecido Adiposo. I. Mariano da Rocha Silla, Lucia, orient. II. Amorin, Bruna, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Banca Examinadora

Professora Doutora Liane Esteves Daudt –PPGSCA-UFRGS

Professor Doutor Ricardo Machado Xavier – PPGCM – UFRGS

Professora Doutora Mariana Bohns Michalowski – UFRGS - HCPA

Agradecimentos

À minha hoje esposa, na época do início deste trabalho namorada, pelo apoio e carinho, aguentando os surtos e compartilhando conselhos muitos importantes, levando normalmente a risadas e descontração necessária à felicidade.

À minha família pelo apoio e carinho durante a realização do trabalho e nas escolhas que acompanham o término desse trabalho e começo do próximo

Especificamente à minha prima que ao seu modo tornou possível o estímulo que guiou o término deste trabalho e os primeiros passos do doutorado.

Aos meus amigos que mantiveram minha insanidade completa do modo mais divertido possível.

À minha orientadora que me aceitou em seu grupo num momento “sem norte” e ensinou muito sobre ciência e o porquê é tão importante fazê-la.

Aos meus colegas de laboratório por auxiliarem ensinando desde as técnicas básicas até a simples companhia e compartilhar de discussões que ensinou muito. E, claro, por me apresentarem instituições dedicadas à parte da vida de laboratório que começa pós expediente, como o lagon e o Chiquinho.

Resumo

Introdução: Células tronco mesenquimais (CTM) são uma população residente nos tecidos adultos de origem mesodérmica, com funções regenerativas de manutenção da integridade tecidual, com destaque no desempenho imunomodulador. Esse aspecto levou as CTM a tornarem-se ferramentas terapêuticas valiosas da pesquisa à assistência ao paciente em doenças autoimunes e de cunho inflamatório. Além disso, CTM podem ser isoladas de materiais tidos como descarte de procedimentos, como dentes decíduos, filtros de transplante de medula óssea e gordura. Nesse panorama, torna-se necessário estabelecer o efeito que a origem tecidual tem na eficiência imunoreguladora e na possível aplicabilidade clínica destas células. **Objetivo:** Comparar o potencial imunomodulador de células mesenquimais isoladas a partir de filtros descartados após a infusão de medula óssea, de lipoaspirado e de polpa de dentes decíduos. **Métodos:** Foi realizada a comparação da capacidade proliferativa de CTMs, cultivadas na presença de lisado plaquetário, das diversas fontes através do cálculo de *population doubling* das CTM em co-cultura com linfócitos T isolados em coluna magnética e com células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com fitohemaglutinina; e determinado por citometria de fluxo o efeito das CTM das diversas fontes sobre as subpopulações linfocitárias. **Resultados:** CTM das três fontes foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos e CTM de tecido adiposo foram mais eficientes em induzir o fenótipo de células T reguladoras e na diminuição de células T citotóxicas. **Conclusão:** comparadas à CTM isoladas de medula óssea e de polpa dentária, as CTM originadas de tecido adiposo exibem efeito imunomodulador mais acentuado.

Palavras chave: célula tronco mesenquimal (CTM); Immunomodulação; polpa dental; lipoaspirado; proliferação; lisado plaquetário.

Abstract

Background: Mesenchymal stromal cells (MSC) reside in most adult tissue of mesenchymal origin, with a broad functions involving cell repopulation and maintenance of tissue homeostasis, through immunomodulatory action. MSC are valuable therapeutic instruments applied from research to autoimmune and inflammatory diseases. MSC can be isolated from diverse discarded biological materials, like lipoaspirate, exfoliated deciduous teeth and bone marrow transplant filters. Therefore it's necessary to establish how source can impact MSC efficiency and possible clinical applications. **Objective:** Compare immunomodulatory potential of adipose MSC and dental pulp MSC to bone marrow MSC. **Methods:** MSC from three selected sources were cocultured with phytohemagglutinin stimulated and magnetically isolated T cells and peripheral blood mononuclear cells; immunophenotype of cocultivated lymphocytes were also conducted. **Results:** MSC from all analyzed sources were capable to inhibit lymphocyte proliferation. Adipose MSC were capable to induce Treg phenotype and decrease T CD8⁺ lymphocytes. **Conclusion:** Cell culture and therapy with MSC present many paradigms and we address to some of those to elucidate the possible most efficient source.

Key Words: Mesenchymal Stromal cells (MSC); immunomodulatory potential; Dental pulp; SHED; adipose tissue; platelet lysate

Lista Abreviações

HGF	Hepatocyte Growth Factor
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
PTH	Parathyroid Hormone
TGF-beta	Transforming Growth Factor Beta
CXCR-4	CXC Chemokine's Receptor
GPDH	Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
GLUT4	Glucose Transporter Type 4
FGF	Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
SHED	Human Exfoliated Deciduous Teeth
MCP	Metaphase Chromosome Protein
CSF-1	Colony Stimulating Factor
KGF	Keratinocyte Growth Factor
IFN- γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
Arg 1	Arginase 1
iNOS	Nitric Oxide Synthase

TLR	Toll Like Receptor
Th	T Helper
MIP	Aquaporin 0
PGE2	Prostaglandin E2
HLA	Class I Human Histocompatibility Complex
FasL	Fas Ligant Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
MV	Microvessicles
GVHD	Graft Versus Host Disease
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Sumário

1.Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	2
2.1 Estratégia utilizada para a revisão da literatura	2
2.2 Células Mesenquimais	4
2.3 Nicho Celular	4
2.3.1 Medula Óssea:	5
2.3.2 Tecido Adiposo	7
2.3.3 Polpa Dentária.....	9
2.4 Extração de células tronco mesenquimais	10
2.5 Papel imunorregulatório das células tronco mesenquimais	11
2.5.1 CTM e Macrófagos	12
2.5.2 CTM e Neutrófilos	13
2.5.3 MSC e mastócitos.....	14
2.5.4 CTM e Células Natural Killer	15
2.5.5 MSC e célula T.....	17
2.6 Microvessículas e imunossupressão	20
2.7 Fontes de CTM e Immunomodulação	22
2.8 Terapia Celular e MSC.....	24
2.8.1 Histocompatibilidade e CTM.....	24
2.8.2 Suplementos de origem animal ou humano para culturas de CTM	25
2.8.3 CTM e engenharia de tecidos.....	25
3. Justificativa	28
4. Objetivos.....	28
4.1 Objetivo Principal	28
4.2 Objetivos secundários.....	28
5. Referências Bibliográficas.....	29
6.Artigo científico	46
7. Considerações Finais.....	62
8. Perspectivas Futuras.....	63

1.Introdução

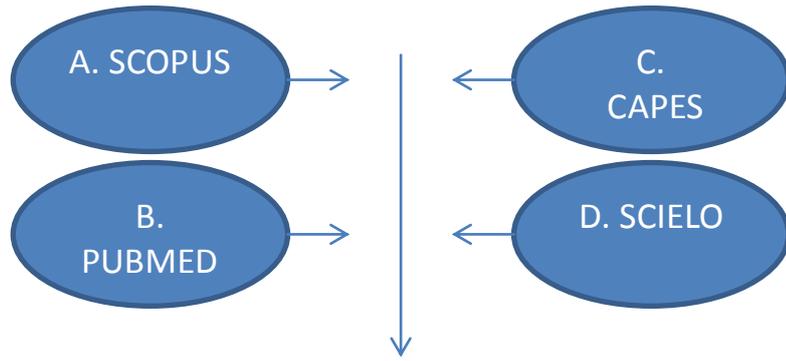
A noção conceitual de origem de vida celular a partir de outra célula e assim uma célula seria a parte menor da estrutura do organismo contribuindo para a manutenção da função e estrutura dos tecidos, pode ser atribuída a teoria de Rudolph Virchow "*omnis cellula e cellula*": toda célula provém de uma célula, introduzindo uma linha de continuidade e renovação tecidual [1]. Quase 100 anos depois, o trabalho de Till e MacCulloch [2] em que células de medula são transplantadas em modelo murino e formam nódulos com proliferação celular *in vivo*, introduz a possibilidade de manipulação da teoria de Virchow com células-tronco de medula, demonstrando a possibilidade de manipular células *in vitro* com aplicação *in vivo* e células *pioneiras* dando origem a outras que cumprem um processo de diferenciação; resultados e teorias como estas geraram muito mais perguntas do que respostas, abrindo as portas para os estudos em células-tronco e sua aplicação terapêutica.

Células-tronco são células indiferenciadas com a característica distinta de contínua auto renovação e geração de clones com a mesma capacidade de replicação e diferenciação. As células tronco são conceitualmente classificadas na literatura como células tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA). A precisa expressão dos fatores de transcrição como Nanog, Gata5, Oct4 e Cdx2 levam a polarização do embrião e a formação da massa celular interna do blastocisto, onde são isoladas as CTE pluripotentes, ou seja, células capazes de gerar vários tecidos e órgãos [3]; primeiro caracterizadas por Cole Edwards em 1966 [4]. As CTAs são células multipotentes residentes nos tecidos somáticos, agindo no reparo e regeneração dos diversos tipos celulares que compõe determinado tecido ou órgão e cujas características são definidas a partir de seu nicho específico [5]. As células tronco mesenquimais (CTM) são CTA, pela capacidade de auto-renovação, que compõe o estroma de diversos órgãos e tecidos.

2. Revisão da literatura

2.1 Estratégia utilizada para a revisão da literatura

A revisão da literatura foca-se em relacionar as características relevantes no panorama multifatorial da relação entre células mesenquimais, subtipos linfocitários e o microambiente dos nichos de origem. A busca foi realizada exclusivamente em meio digital, nas plataformas Scopus, Pubmed, CAPES e Scielo (Regional). As termos chave utilizados foram: 1 mesenchymal stem cell 2 comparison of MSC sources 3 Adipose derived MSC 4 Mesenchymal stem cell immunomodulatory potential 5 MSC immunomodulation mechanisms 6 Mixed lymphocyte reaction 7 MSC lymphocyte coculture 8 Platelet Lysate.



20	←	22662	A	1	C	9459	→	4
		13954	B		D	113	→	10
10	←	2165	A	2	C	183	→	11
6	←	169	B		D	0		
8	←	1582	A	3	C	1722	→	5
12	←	582	B		D	3	→	2
5	←	563	A	4	C	1224	→	4
9	←	472	B		D	1		
6	←	213	A	5	C	971	→	9
12	←	472	B		D	0		
9	←	40	A	6	C	757	→	6
7	←	3571	B		D	3		
		7	A	7	C	321	→	8
12	←	152	B		D	0		
		2	A	8	C	1134	→	15
		568	B		D	8		
8	←	118	A	1+8	C	160	→	3
6	←	93	B		D	0		
		2	A	3+8	C	43	→	2
12	←	6	B		D	0		
		248	A	1+6	C	281	→	4
8	←	194	B		D	0		
1	←	1	A	7+8	C	13	→	1
1	←	1	B		D	0		

2.2 Células Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM), um tipo específico de CTA, foram primeiramente identificadas por Friedenstein [6] [7] a partir da medula óssea, e chamadas por ele de unidades formadoras de colônia de fibroblasto (CFU-F), pelo formato similar à fibroblastos, pela característica de adesão ao plástico e pela capacidade de diferenciação em linhagens derivadas do mesoderma como osteócitos, condrócitos e adipócitos. A medula óssea, derivada do mesoderma, possui células multipotentes hematopoiéticas responsáveis pela renovação de células sanguíneas, e CTM as quais residem no microambiente celular que constitui o estroma da medula óssea e auxiliam na hematopoese [8]. Hoje se sabe da presença de CTM nos diversos tecidos: fígado [9]; tecido adiposo [10]; pulmões [11]; coração [12]; polpa dental [13]; músculo [14]; cordão umbilical [15] [16]; placenta, polpa dentária, membrana sinovial e tendões [17].

A CTM pode apresentar uma grande variedade de antígenos de superfície das várias populações celulares presentes nos tecidos fonte, não existindo ainda um marcador único para caracterizá-las. A variedade de proteínas expressas na membrana também é influenciada por transcriptoma distinto [18]. A “*International Society for Cellular Therapy*” (ISCT), nomeou regras para que uma célula possua corretamente a nomenclatura de mesenquimal: isolamento pela característica aderente ao plástico; diferenciação em tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo; marcadores positivos de superfície celular como CD 105, CD73 e CD90 e ausência dos marcadores de células tronco hematopoiéticas, CD 14, CD34 e CD45 [19].

2.3 Nicho Celular

A pesquisa em CTM está ancorada em uma meta: reparo tecidual. A estratégia tanto de pesquisa quanto de aplicação clínica está em como conduzir os mecanismos celulares para atingir essa proposta. Um dos maiores reguladores da função da célula mesenquimal é o microambiente altamente dinâmico em que ela está inserida no tecido [20]. O termo nicho (do inglês “niche”) foi primeiramente utilizado

por Schofield em 1878, na proposta de que as células mesenquimais seriam mantidas indiferenciadas pelas células vizinhas, a não ser que esse equilíbrio mude, levando a mitose e a uma progene diferenciada [21]. O nicho existe como um fator de equilíbrio baseado em: contato célula-célula; fatores, citocinas e exossomos secretados; inflamação; sinalização pela membrana extracelular; parâmetros ambientais como elasticidade e volume de oxigênio dissolvido [22].

2.3.1 Medula Óssea:

O estroma medular apresenta uma estrutura espacial organizada para suas diversas linhagens celulares. As células tronco pode concomitantemente apresentar um papel proliferativo, com capacidade de sair rapidamente do estado G0, ou quiescente, com perfil de reconstituição de longo prazo no nicho [23] [24]. Li et al. sugeriram um modelo de zoneamento, de modo que a região medular dominada por osteoclastos favorece o perfil estocástico e a sinalização do endotélio vascular induz um perfil mais ativo e proliferativo [25].

O papel regulatório que as CTM exercem sobre as CTH tem sido demonstrado por vários autores. Nilson et al demonstraram a presença de células-tronco hematopoiéticas (CTH) transplantadas na região endosteal da medula, sugerindo a relação de nicho com os osteoblastos [26]. A função do osteoblasto sobre o nicho na medula óssea é reforçada pela secreção de fatores de crescimento, principalmente HGF (do inglês - hepatocyte growth fator) e G-CSF (do inglês - granulocyte colony-stimulating fator) e por evidências de aumento da proliferação celular em técnicas de co-cultura in vitro, [27] [28] [29]. Calvi et al. comprovaram o papel regulatório dos osteoblastos sobre a proliferação das CTH in vivo e in vitro; o aumento do número de osteoblastos está diretamente relacionado ao aumento específico de células progenitoras, através do contato célula-célula evidenciado pela influência do receptor NOTCH e seu ligante JAGGED-1, e do estímulo pelo hormônio PTH (do inglês-Parathyroid Hormone) in vivo [30] [31]. Complementarmente, o PTH age no ancoramento das células ao nicho através da expressão de SDF-1 [32]. A ablação de osteoblastos leva a redução no número de células na medula, podendo levar a hematopoiese extramedular no baço. No

entanto, a falta do osteoblasto quebra o equilíbrio do nicho, mas não é individualmente capaz de parar a hematopoese, evidenciando a presença de outros fatores [33].

A regulação do ciclo circadiano com liberação de hormônios adrenérgicos pelo sistema nervoso simpático regula a mobilização das células-tronco hematopoiética e a proliferação de osteoblastos. A ativação dos receptores β -adrenérgico leva a diminuição da fosforilação do fator de transcrição Sp1, necessário para a ativação do gene da proteína CXCL12, levando a mobilização de CTH do nicho medular para a corrente sanguínea [34]. As células do sistema nervoso, particularmente as células de Schwann – células da glia não mielinizadas, também apresentam regulação direta no nicho medular pela ativação do TGF- β que induz a CTH a um perfil quiescente [35]. O TGF- β em estado inativo ligado à matriz extracelular é secretado por diversas células na medula óssea, mas principalmente por megacariócitos, [36].

Corroborando as evidências de Li et al. em que células do endotélio suportam in vitro o estado proliferativo e capaz de repopular o nicho de células de medula, Kiel et al. demonstraram a presença de CTM no endotélio sinusal de capilares da medula através da expressão diferencial da família SLAM de proteínas de membrana nas células progenitoras [37] [38]. Desse modo, a constituição espacial da CTM no estroma medular está co-localizado com eixos de sinalização: SDF-1 (também chamado de CXCL12) com o receptor CXCR4 [39]; através das junções gap CX43 e CX45 [40]; da presença de células reticulares abundantes em CXCL-12, também chamadas de “CAR” (do inglês – CXCL12 abundant reticular cells) [41]

A CTM está localizada na proximidade das CTH e são caracterizadas in situ como Nestin-GMP+ e/ou positivas para o receptor leptina (LepR+). Frenette et al demonstraram que células transfectadas com GMP, (sob a ativação do promotor de nestina, chamando essas células de Nestin-GMP+), Encontram-se adjacentes às CTH na região perivascular expressando transcriptoma de genes constitutivos da manutenção e quimiotaxia da CTH: CXCL12, “osteopietin”, interleucina-7 e “vascular cell adhesion molecule-1”. A deleção desses genes levou a redução no número de células hematopoiéticas. Os autores também co-localizaram células Ostrix+, fator de transcrição ósseo, com células Nestin-GMP+ no espaço entre a

trabécula óssea e os vasos sanguíneos, indicando a influência das CTMs na osteogênese [42]. Morrison et al demonstraram que CTM LepR⁺ da medula óssea têm a capacidade de modular a atividade proliferativa da CTH multipotente. As CTM LepR⁺ expressam CxCL12 e SCF – moléculas envolvidas na regulação da CTH e a deleção no gene do LepR leva a perda de CTH, indicando participação da CTM na manutenção da CTH [43]. Finalmente, Zhou et al demonstraram que as células LepR⁺ são normalmente quiescentes, entrando em diferenciação osteogênica e adipogênica em caso de lesão [44].

2.3.2 Tecido Adiposo

O tecido adiposo, inicialmente considerado um simples armazenador de energia, consolidou-se como um órgão endócrino de função complexa; Wertheimer e Shapiro foram os primeiros, em 1948, a considerar que o tecido adiposo era metabolicamente ativo e regulado por fatores sinápticos e endócrinos [45]. Existem basicamente dois tipos de gordura: marrom e amarela. A gordura marrom é responsável por transformar a energia armazenada em calor e a amarela por armazenar energia e liberá-la em vesículas metabolizáveis pelas células dos tecidos [46].

A possibilidade de extração de células multipotentes do tecido adiposo foi evidenciada, assim como sua cito-morfologia, em 1976 por Van e col. [47]. Hauer e col., em 1989 demonstraram a capacidade de diferenciação adipogênica dessas células, induzidas por cortisol, “*lipase lipoprotein*” e “*glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)*” [48]. Zuk e col. foram os primeiros a demonstrar, em 2001, as características de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica a partir de células isoladas de lipoaspirado, caracterizando propriamente as células multipotentes do tecido adiposo como células mesenquimais [49].

Dada a grande disparidade de nomenclaturas utilizadas na literatura para descrever células derivadas do tecido adiposo, aderentes ao plástico, capazes de após múltiplas passagens manter sua característica multipotente, a Sociedade Internacional de Tecnologia Aplicada a Gordura (do inglês-*International Fat Applied Technology Society* – IFATS) estabeleceu a normativa de nomenclatura células

tronco/estromais derivadas de tecido adiposo (do inglês *adipose-derived stromal/stem cells* (ADSC) [50].

As ADSC residem no endotélio perivascular do tecido adiposo [51]. Traktuev et al col. co-localizaram ADSC na microvasculatura do tecido adiposo, classificando-as como células $CD140^+CD34^+CD31^-CD45^-CD144^-$ capazes de rápida diferenciação adipogênica [52]. Zimmerlin e col. elucidaram a localização *in situ* investigando marcadores conhecidos do endotélio e caracterizaram uma população perivascular $CD90^+ CD34^+ CD31^- CD146^- smA^-$ [53]. Em outro trabalho, Traktuev demonstrou a aplicação de implantes *in vivo* realizados após bioengenharia *in vitro* com colágeno, células progenitoras endoteliais e com células ADSC. O biomaterial estabilizou o fluxo sanguíneo no local do transplante em quadro dias com a presença de neovascularização e a melhora da estrutura do endotélio [54]. Desse modo, o desenvolvimento do tecido adiposo leva a formação de novos vasos que sinalizam tanto o recrutamento de ADSC quanto sua diferenciação em adipócitos [55]. De modo similar, o VEGF sinaliza a diferenciação de ADSC em células do endotélio vascular [56].

A sinalização do nicho para o comprometimento da ADSC com a linhagem adipogênica é vital e estimulada principalmente por picos de insulina e pelo excesso de glicose. Os adipócitos secretam adipocinas (do inglês, "*adipokines*") [57] que induzem as ASDC do estado pluripotente a pré-adipócitos, principalmente pela sinalização via de BMP4, BMP2, WNT e Hg. Na presença de açúcares, as vias de sinalização tem "feedback" positivo e levam a expressão de diferentes receptores, como GLUT4 e de lecitina [57][58].

A hypoxia é um fator determinante no tecido adiposo. O aumento do volume do tecido, principalmente em casos de obesidade, resulta em ambiente hipóxico para as células e sinaliza a diferenciação adipogênica e a expansão clonal para as ADSC [59] [60] [61].

"*Fibroblast growth factor*" (FGF) tem papel clínico relevante na homeostase do nicho da célula ADSC. Wang e col. demonstraram que enxertos de tecido adiposo suplementados com células ADSCs cultivadas com "*basic fibroblast growth factor*" (bFGF) tiveram aumento na sua sobrevivência. O aumento de VEGF e PDGF,

possivelmente leva ao aumento da vascularização do enxerto [62]. Tang et al descreveram que bFGF aumenta a proliferação, diferenciação e expressão de “*hepatocyte growth factor*” (HGF) no transplante de ADSC em fígado cirrótico. Os autores co-localizaram as células transplantadas com as áreas de fibrose *in situ*, com pequena melhora funcional mas com a inibição da formação de novos sítios fibrosos. Ainda, a co-cultura de ADSC com tecido hepático leva ao aumento da proliferação dos hepatócitos, da expressão de HGF e da apoptose de células estreladas do fígado via ativação de JNK-p53 [63].

2.3.3 Polpa Dentária

A dentição dos mamíferos apresenta morfogenética e distribuição espacial preservada [64]. Os dentes são constituídos a partir de diferentes locais na cavidade oral em resposta a estímulos; o gene *homeobox* foi sugerido por Mitsiadis et al. como um dos principais agentes na formação da dentição. As células tronco derivadas da crista neural, são ativadas pela concentração de BMP e FGF secretadas pelas células epiteliais, elevando a ativação do Homeobox [65].

CTMs foram identificadas em diversos locais na cavidade oral: polpa dentária; papila apical, ligamento periodontal, gengiva e dentes decíduos [66].

No desenvolvimento do dente, odontoblastos secretam a primeira camada de dentina e começam a mover-se para a região mais interna da papila, formando a matriz de dentina. A polpa dental é delimitada externamente por uma camada de odontoblastos. Abaixo existe uma camada rica em matriz extracelular, vasos sanguíneos e tecido nervoso não mielinizado [67]. O tecido dental, mesmo que histologicamente dividido em camadas, é um órgão funcional com comunicação entre suas partes, formando o “complexo polpa-dentina”. Isso permite que a polpa reaja a agressões mesmo que estas atinjam as camadas mais externas do dente. A ativação de receptores de complemento C5aR levam a ativação e migração de células-tronco progenitoras da polpa as camadas mais externas[68].

Dentes decíduos e permanentes apresentam pequenas diferenças. Os decíduos apresentam menor matriz de dentina e polpa mais volumosa. Gronthos e

col. em 2000, isolaram células multipotentes, com grande capacidade proliferativa a partir da polpa de dentes decíduos [69], SHED (do inglês “*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*”)

O processo de reabsorção da raiz do dente decíduo altera a constituição da polpa e sua relação com o nicho. Yildirim, através da análise de mRNA elucidou alguns dos fatores de transcrição ativos na polpa durante esse processo, encontrando diminuição de OPG, Cbfa-1, TGF- β e o aumento da expressão de RANKL, MCP-1 e CSF-1[70]. Esse aumento de citocinas e de células inflamatórias durante o período de reabsorção sinaliza a ativação e a proliferação das células tronco [71]. As SHED apresentam papel modulador durante o processo de reabsorção, impedindo a ação inapropriada dos osteoclastos e protegendo o tecido circundante [72]. Zhu et al elucidaram as diferentes características das SHED nesse processo; perfil osteoclastogênico durante o processo de reabsorção mudando para imunomodulatório ao final [71]. Fitzgerald descreveu células perivascuares presentes na polpa capazes de uma reorganização e proliferação celular quando induzidas por lesão, adquirindo a morfologia de odontoblastos. De mesmo modo, células presentes nas regiões mais distais e, portanto, mais profundas no endotélio pulpar, migram para a área de lesão e se proliferam. Desse modo, Fitzgerald já demonstrava em 1990 a presença de SHED capazes de diferenciação e expansão clonal, na região perivascular e em regiões mais profundas [73].

Karaoz et al elucidaram o proteossoma do nicho das SHED através de sequenciamento MALDI-TOF. O autor divide as proteínas em 10 grandes grupos, entre eles proteínas estruturais ligadas a actina; metabolismo redox; controle de transcrição e “folding”; metabolismo do cálcio; apoptose e produção de interleucinas [74].

2.4 Extração de células tronco mesenquimais

A partir do conhecimento de que existem CTM nos diversos tecidos somáticos foram desenvolvidas diversas técnicas para isolar a célula de forma a manter sua característica multipotente, assim como, a correta caracterização estabelecida pela ISCT.

A técnica mais clássica para tanto é utilizando a seleção por adesão ao plástico, como Friedenstein descreveu. O aspirado de medula óssea, ou sangue de cordão umbilical é colocado em contato com um gradiente de densidade e centrifugado, isolando-se assim a fração corresponde contendo as células mononucleares. Caso seja utilizado tecido adiposo ou polpa dentária, primeiramente utiliza-se a digestão com enzima Colagenase tipo I ou tipo IV. Procede-se com a centrifugação sem a necessidade do gradiente de densidade. Após, plaqueia-se as células adicionando DEMEM (“dulbecco's modified eagle's medium”), antibiótico e suplemento, normalmente soro fetal bovino ou lisado plaquetário. Leva-se as células para uma estufa com condições de crescimento apropriadas: 37°C e 5% de CO₂. Após 48 ou 72 horas retira-se todo o meio deixando somente as células aderentes. Ao chegar a confluência de 80% faz-se a digestão enzimática das proteínas de adesão, com tripsina, soltando as células, as quais são contadas e replaqueadas no que se denomina passagem zero. Repete-se o processo até a passagem desejada.

Em termos de extração de células o tecido adiposo apresenta a vantagem de acessibilidade em relação à medula óssea. Pode-se coletar grandes quantidades de lipoaspirado com um procedimento minimamente invasivo e, principalmente, há diariamente lipoaspirado descartado de cirurgias plásticas sendo, portanto, mais barato e disponível inclusive para uso autólogo. Devido ao volume superior de lipoaspirado em relação às coletas de medula, pode-se obter um número maior de células. Assim, CTM de tecido adiposo são um ótima fonte para a pesquisa ou aplicação clínica, podendo também ser extraídas de pedaços de gordura, obedecendo os protocolos de “*Good Manufacturing Practices*”. [75]

2.5 Papel imunorregulatório das células tronco mesenquimais

Inicialmente cogitou-se que o papel funcional das CTM nas diversas aplicações devia-se ao “homming” e diferenciação nos tecidos. Contudo evidências sugeriram que o potencial terapêutico é exercido sem o enxerto permanente nos tecidos, mas através de outros mecanismos de ação como secreção de citocinas, fatores de crescimento e exossomas. O papel regulatório das CTM é também

ilustrado pela capacidade que estas células tem de modular sua expressão gênica a partir de sua interação com o microambiente [76] [77].

Diante das evidências de um papel predominantemente regulatório, a aplicabilidade clínica das CTMs tem sido investigada em um panorama de regeneração tecidual. Para tanto, é necessária a interação destas células com as do sistema imunológico, tanto para proteger o tecido do dano possível em reações inflamatórias graves, quanto para otimizar a eliminação de patógenos através da ativação imune local. CTMs parecem exercer vigilância imunológica sobre o microambiente pelo contato célula-célula e por fatores solúveis pró-inflamatórios [78]. Desse modo, além do seu potencial regulatório sobre a regeneração e proliferação celular, as CTMs, quando utilizadas terapeuticamente, parecem funcionar como um mecanismo de entrega local de diferentes mediadores moleculares respondendo às alterações que os processos patológicos celulares geram no microambiente afetado e assim, promovendo o retorno a homeostase tecidual.

2.5.1 CTM e Macrófagos

Monócitos e macrófagos teciduais estão presentes durante todo o processo de reparo tecidual; isso levou a caracterização destes como principais atores na resolução da inflamação e reestruturação da integridade tecidual. A ação benéfica dos macrófagos deve-se principalmente pela secreção de fatores tróficos no sítio de lesão, estimulando o parênquima celular e o sítio inflamatório como um todo [79] [80]. Na medula óssea, macrófagos estimulam diretamente as células tronco mesenquimais Nestina⁻GMP⁺ pela expressão de fatores tróficos que estimulam a manutenção e sobrevivência de longo tempo. A depleção de macrófagos aumenta a mobilização de CTH para o sangue periférico, diminuindo nas CTMs a transcrição de genes de manutenção como angiopoietina-1, CXCL12, SCF, VCAM1 e relacionados à linhagem osteogênica [81]. Reciprocamente, CTMs presentes na medula são capazes de estimular a retenção ou saída de monócitos [82].

CTMs recrutam monócitos e macrófagos em sítios de inflamação. Chen et al demonstraram que CTMs exercem quimiotaxia sobre a migração de monócitos CD14⁺ e de células endoteliais através da secreção de EGF, KGF (*keratinocyte*

growth factor) *insulin-like growth factor-1*, VEGF-a, eritropoietina e SDF-1. A aplicação do meio condicionado de cultura de CTM em feridas acelerou a cura e o recrutamento de macrófagos [83].

Macrófagos também são células com grande plasticidade. Macrófagos com fenótipo M1 estão envolvidos com os estágios iniciais da inflamação estimulados pela presença no microambiente de IFN- γ , LPS e/ou TNF- α ; eles podem secretar IL-12, IL-23, TNF α , IL-1 β , formas reativas de oxigênio e nitrogênio, além de quimio atratores como CXCL9, visando eliminar patógenos. O fenótipo M2 já caracteriza-se pelos estágios mais finais, buscando a recuperação da homeostase, secretando IL-10, CCL17, CCL22, CCL24 [80].

CTMs podem induzir macrófagos para o perfil M2 através do aumento da expressão de Arg1 em macrófagos M1, as CTMs inibiram a expressão e atividade da enzima oxido nítrico sintase (do inglês *nitric oxide synthase* (iNOS), suprimindo o fenótipo M1 e elevando o M2 [84]. Chen et al demonstraram *in vitro* que a cocultura de CTM com monócitos pode induzir a secreção de IL-10 e inibir a proliferação de linfócitos T [85]. Desse modo, CTMs têm a capacidade de recrutar monócitos e macrófagos para sítios de lesão, buscando a resolução da inflamação através do fenótipo M2.

2.5.2 CTM e Neutrófilos

Neutrófilos são fundamentais na resposta antimicrobiana. Normalmente encontrados circulantes, podem chegar rapidamente aos sítios de dano e infecção.

Raffaghello et al foram os pioneiros em demonstrar a interação entre CTMs e neutrófilos. Eles demonstraram que CTMs, mesmo em concentrações baixas podem inibir a apoptose de neutrófilos ativados e reduzir o *burst* oxidativo (intensa secreção de formas reativas de oxigênio), sem afetar a capacidade fagocítica, a expressão de moléculas de adesão ou capacidade migratória [86].

O aumento da expressão da proteína mitocondrial Bax marca a apoptose espontânea em neutrófilos; o aumento da expressão de MCL-1 na mitocôndria tem o efeito reverso. IL-6 secretada por CTMs pode resgatar neutrófilos de um estado pró apoptótico pelo aumento de MCL-1, através do fator de transcrição STAT3 [86]. Além disso, a ativação do receptor TLR-3 nas CTMs leva a liberação de IL-6 e IFN- β , auxiliando na manutenção e função dos neutrófilos nos sítios de lesão [87].

Quando ativadas com LPS bacterianos, CTMs recrutam e sensibilizam neutrófilos à presença de bactérias. LPS aumenta a produção de IL-6 e IL-8 nas CTM levando a sensibilização e ao recrutamento de neutrófilos, via CCL4, aumentando assim o seu potencial fagocítico [88] [89]. Além disso, quando em presença de outras células do sistema imune, como linfócitos Th17, as CTMs estimulam a secreção de IL-17 para aumentar a ação fagocitária dos neutrófilos sobre bactérias [90].

Neutrófilos e CTMs relacionam-se também no mecanismo de invasão tecidual, rolamento, adesão e migração. Lin et al co-localizou imagens em modelo de dano estimulado por LPS. A perfusão de CTMs no tecido após infusão intravascular, parece estar relacionada à presença de neutrófilos no local.[91]. Por outro lado, CTMs podem atenuar a função dos neutrófilos. Wang et al . demonstraram que a infusão de CTM em modelo murino de dano ventilatório pulmonar, reduz a perfusão tecidual de neutrófilos e sistemicamente, a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α , e de quimio atratores, como MIP-2.[92]

2.5.3 MSC e mastócitos

Mastócitos são uma população heterogênia de células distribuídas nos tecidos do corpo. Essas células podem variar o conteúdo de seus grânulos, seus ativadores e a forma como eles responde a estímulo. A resposta dos mastócitos está presente em todas as fases do reação imune, desde a resposta a patógenos, até regular a imunidade inata para tolerância de tecidos [93]. Essa vasta gama de ações tem fundamento na capacidade dos mastócitos secretarem um amplo espectro de substâncias moduladoras, agindo na remodelação tecidual [94].

Kang et al. demonstraram a função protetora das CTMs, inibindo a infiltração e principalmente a degranulação de mastócitos, induzida por IgE. CTM de medula exerceram efeito supressor através do contato célula-célula, diminuindo a ação do domínio de oligomerização no nucleotídeo NOD2 (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain 2*). Já CTMs de cordão umbilical exerceram a função imunossupressora por mecanismo parácrino, através da secreção de PGE-2 e TGF- β 1 [95]. Em contrapartida, Martin et al demonstraram que a secreção de serotonina por mastócitos induz a proliferação de CTMs e aumenta seu potencial de diferenciação miogênica [96]

Liang et al col. demonstraram o efeito benéfico de CTM em modelo de alergia através de mecanismo parácrino. A administração tópica de meio de cultura de mesenquimais estimuladas com TNF- α reduziu os sinais locais de inflamação, principalmente a permeabilidade induzida por histamina, pela redução do fator de transcrição kbp65, da secreção de TNF- α e de IL-4. *In vitro*, a co-cultura com CTMs impediu a ativação de mastócitos assim como a secreção de IgE por células B [97]

2.5.4 CTM e Células Natural Killer

Células Natural Killer (NK) mantém vigilância contra células colonizadas por vírus e células tumorais. Células NK atacam células transformadas ou infectadas através de grânulos citolíticos com perforina e granzima, através de receptores que sinalizam morte celular, e por estimula de anticorpos, mecanismo de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpos(ADCC, do inglês *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) . A ativação dessas células ocorre através de um grande número de receptores, permitindo responder rapidamente a mudanças no microambiente. Além dos receptores para a porção Fc dos anticorpos (CD16) há duas classes de receptores: ativadores e inibitórios. Os inibitórios respondem por mecanismo de “missing self”: o não reconhecimento de moléculas do HLA-I, constitutivamente expressas nas células, marcam a célula para ação da NK. Os de ativação reconhecem proteínas de patógenos ou de *stress* celular. O balanço entre sinal de ativação e inibição é o determinante para a ação da célula NK [98]

Células NK são caracterizadas imunofenópicamente como CD56⁺, conjuntamente com CD16⁺ ou CD16⁻, e CD3⁻ [99] [100]. Baseado na imunofenotipagem de CD56, as células NK podem ser separadas pela intensidade da expressão deste receptor, CD56 *bright* com alta expressão e CD56 *dim* com expressão mais baixa.[101]. Isto relaciona-se com a função da célula NK, sendo que CD56*dim* apresenta um perfil mais citotóxico e CD56*bright* mais secretor de citocinas [102] [103].

Como exemplo da dualidade da célula NK, elas podem matar ou estimular a maturação de células dendríticas, podem ser estimuladas por citocinas, como IL-2 e IL-15 ou ativadas por TLR (do inglês *Toll like receptor*) por patógenos, liberando IFN- γ , o qual estimula macrófagos a um perfil M1 [104]

Moretta et al elucidaram a relação CTM com a célula NK através dos receptores de ativação DNAM-1 e NKG2D e dos de inibição por HLA-I. Os autores demonstraram que CTMs expressam ligantes de DNAM-1, PVR e Nectin-2, assim como ligantes de NKG2D, ULBP e MICA. As células NK, cultivadas com os ativadores IL-2 e IL-15, foram efetivas em lizar CTMs autólogas e alogênicas em modelos de co-cultural. IFN- γ tem um papel fundamental na interação das CTMs com NK já que aumenta a expressão de HLA-I na superfície das CTMs, desse modo podem diminuir a ativação de células NK e permitir que as mesenquimais existam em sítios com células NK ativas. Contudo, sítios de lesão e inflamação apresentam sinalização e secreções bastante complexas e outros fatores além do IFN- γ devem agir in vivo [105].

De todo modo, o aumento da expressão de HLA-I nas mesenquimais também reduz outros receptores que podem ativar células NK, levando a imunomodulação sobre a NK. Flohé et al demonstraram que células mesenquimais podem aumentar a secreção de IFN- γ pelas próprias células NK [106]. Além disso, Moretta et al demonstraram que células mesenquimais, quando utilizadas como alvo estimulatório para as células NK, não foram lisadas, de modo que o aumento de expressão de HLA-I das CTM induzida por IFN- γ , impediu a ação citotóxica das células NK [107]. O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que células NK pré-ativadas com IL-2, quando co-cultivadas com seus alvos e células mesenquimais, tem seu potencial de lise e a expressão dos receptores de ativação NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D, e CD69 reduzidos. Os autores, contudo, não encontraram alteração dos receptores nas células NK CD56^{bright}CD16⁻ ou CD56^{dim}CD16⁺, portanto não alterando sua atividade por ADCC [108] [109]. Entretanto, quando células NK são estimuladas por longo tempo ou quando em alta concentração, tornam-se eficientes em eliminar células mesenquimais. Esse efeito é reduzido quando IFN- γ exógeno é adicionado, pela diminuição da liberação de perforina e de grânulos líticos [110].

Desse modo, o efeito de supressão de citotoxicidade pela célula mesenquimal e sua possibilidade de lise pela célula NK, são ambos reversíveis dependendo da sinalização no sítio de inflamação. Células NK podem apresentar papel de quimiotaxia sobre as células mesenquimais. Barbosa et al demonstraram que células NK são capazes de estimular a migração de CTM em resposta a presença de fibrinogênio frequentemente encontrado em locais de dano [111]. Além disso, a

ativação do receptor TLR-3 nas CTM, também estimulam a imunomodulação e diminuição de secreção de citocinas e a ativação de células NK de forma independente da expressão de HLA-I. Desse modo, além de proteger a si, a CTM pode exercer imunomodulação para proteger os tecidos ao redor do local de inflamação [112].

Transplantes de órgãos sólidos podem exercer um efeito ainda não muito bem elucidado na relação de células NK com CTMs. Células NK de pacientes que realizaram transplante de rim parecem ter o potencial citolítico sobre as mesenquimais do doador após o transplante [105].

Células mesenquimais podem exercer um efeito negativo pela ação sobre as células NK. A infusão, em modelo murino, de células NK conjuntamente com células mesenquimais, parece prejudicar o efeito anti-tumoral exercido pelas NK. Os autores ainda demonstraram a persistência da inibição em injeções conjuntas ou até em intervalos de 48 horas entre a infusão dos dois tipos celulares, com CTM primeiro e NK 48 horas após, demonstrando o possível efeito sistêmico das CTM . [113]. Tseng et al elucidaram a hipótese de que a dualidade de estágios, entre citotóxico e secretor de citocinas, é importante para a homeostase da função da célula NK; caso ela encontre células cancerígenas, a NK poderá apresentar um perfil citotóxico. Contudo, estroma e imunomodulação pela CTM pode levar à mudança para um perfil secretor de citocinas. Desse modo, os dois estágios de desenvolvimento da célula NK poderia influenciar o estroma juntamente com as células mesenquimais [114] .

2.5.5 MSC e célula T

Células T existem no estado *naïve*, maduro não ativado; efetora, citotóxica ou produtora de citocinas; de memória. A vasta maioria de células T *naïve* são CD4 ou CD8 positivas, sendo ativadas à células efetoras, sendo C8⁺ portadoras de perfil citotóxico e CD4⁺ secretor de citocinas, divididas em Th1, Th2, Th17 e Treg a partir do perfil de citocinas que produzem. Th1 e Th2 serão detalhadas mais abaixo. Th17 atuam nos sítios de inflamação como recrutadores de neutrófilos e macrófagos, assim como estimulam sua produção medular, e na secreção de peptídeos antimicrobianos pelos queratinócitos. Células Treg atuam com perfil imunomodulador, secretando TGF- β , IL-10 [115]

Células T podem ser geradas normalmente pela homeostase do organismo ou ter sua expansão clonal induzida por estímulos externos, como infecções, estímulo de citocinas em sítios inflamatórios ou ainda por mitógenos, *in vitro*[116] .

A interação entre CTM e linfócitos T foi bastante estudada, principalmente *in vitro*. As mesenquimais podem modular a função das células T especialmente no controle do ciclo celular, da proliferação e secreção de citocinas. Além do caráter do mecanismo ser importante, a reversibilidade da inibição é fundamental e denota que a célula mesenquimal pode exercer sua influência sem mecanismos deletérios, ou de morte celular [117] O contato célula-célula exerce grande impacto na relação entre os dois tipos celulares. A expressão de proteínas de adesão, receptor de células T (TCR, do inglês, *T cell Receptor*) e PD-1 (do inglês, *programmed death-1*) permite que as células mesenquimais se liguem as células T e induzam um fenótipo imunomodulador, através da diminuição da expressão de mRNA da família de moléculas STAT, que agem como transdutoras de sinal ou por modulação da expressão de receptores para TGFb1, IL-10, e IL-12 [118] [119][120].

As células mesenquimais respondem ao estímulo provindo do microambiente de células inflamatórias. CTM apresentam receptor para IL-17, o qual age estimulando a sua proliferação de maneira dose dependente. Desse modo, a liberação de IL-17 em sítios inflamatórios leva a expansão de CTM, facilitando a ação imunomoduladora dessa população. Células mesenquimais estimuladas *in vitro* com IFN- γ , aumentaram a expressão de moléculas de adesão ICAM, aumentando o tempo de ligação das CTM com células T produtoras de IL-17(Th-17). As CTM suprimiram a produção de IL-17 nessas células e induziram o fenótipo de células T regulatórias (FoxP3⁺) produtoras de IL-10. Em contrapartida, CTM também podem estimular a ação de células Th-17 quando adicionadas a culturas *in vitro* de células T recém estimuladas [121]. . Desse modo, o perfil supressor ou o suporte às células T depende do microambiente

Dazzi et al demonstraram que células T co-cultivadas com células mesenquimais, têm seu ciclo celular parado em G0/G1 após 48 horas. MSC inibem a expressão de ciclina D2 (do inglês *cyclin D2*), uma das proteínas que marcam a entrada no ciclo de divisão celular, sem impedir a expressão de outras proteínas. Ainda permanece a pergunta se células mesenquimais mantêm esse efeito com células T já estimuladas, retornando da fase S para a G1/G0 [122] .

PDL-1 (do inglês *programmed death legend 1*) é uma molécula inibitória presente nas reações imunes. O aumento de expressão de PDL-1 nas CTMs é concomitante com a supressão da proliferação de linfócitos T e com o aumento de IFN γ no sobrenadante de co-culturas, *in vitro*. Desse modo, o interferon produzido por células T, também por CD4⁺ mas principalmente por CD8⁺, aumenta a expressão de PDL-1 nas mesenquimais, induzindo um fenótipo imunomodulatório. Autores também relacionaram este efeito inibitório com TNF- α , mas somente IFN está relacionado com a expressão de PDL-1[123][124]

Células T "helper" (Th) são células T CD4⁺ produtoras de citocinas que interagem com HLA classe II. A diferenciação de células Th em células Th efetoras Th1 ou Th2 depende do complexo de citocinas presente no microambiente inflamatório no momento da estimulação pelo HLA. Quando células CD4⁺ são ativadas na presença de IL-12, IFN- γ e IL-27 tendem a se diferenciar em Th1. Essas células são responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares, mas a reação exacerbada pode levar a doenças autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1 e doença de Crohn [125]. A diferenciação no perfil Th1 é diminuída quando realizada a co-cultura com CTM, possivelmente pela presença de células T regulatórias secretoras de IL-10 [126] [127]. Além disso, células tronco mesenquimais podem induzir perfil imunomodulatório em células dendríticas. A secreção de PGE-2 pelas células mesenquimais estimula a produção de TGF- β pelas células dendríticas induzindo a diferenciação de células Treg, as quais podem agir sobre Th1 [128].

O perfil de células Th2 é favorecido quando células T CD4⁺ são estimuladas em presença de IL-4, a qual pode ser produzida pela própria Th2 como mecanismo de feedback positivo, IL-9, IL-5, IL-10 e IL-13. A reação exacerbada de Th2 está associada a patologias alérgicas pela produção de IgE [125]. CTMs podem suprimir a secreção das células Th2, reduzindo a secreção de IgE [129]. Além disso, modelos *in vivo* demonstraram que as CTMs melhoram os efeitos alérgicos periféricos induzindo mudança no epitélio e suprimindo células apresentadoras de antígeno, visando diminuir a reação alérgica [130]

Células T regulatórias (Treg), um subtipo de células T CD4⁺, possuem funções imunossupressoras, agindo na prevenção de doenças autoimunes e na resolução do processo inflamatório. Células Treg são caracterizadas como positivas para receptor de superfície para IL-2 (CD25) concomitantemente com o CD4 e, principalmente, a expressão do fator de transcrição intracelular FoxP3. Essas células

exercem potente imunossupressão sob os subtipos de células T e outros mediadores imunes.[125]. English et al demonstraram que células mesenquimais são capazes de induzir a presença de células FoxP3⁺ em culturas purificadas de T CD4⁺ através do contato célula-célula. O contato induz a liberação de PGE-2 e TGF-β, favorecendo a presença de Tregs [131].

Prevosto et al caracterizaram células Treg além do clássico CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. A população de células T CD8⁺ também podem ser induzidas à capacidade supressora quando em contato com células mesenquimais, com fenótipo CD8⁺ CD28⁻, CD8⁺ CD25⁺ e CD8⁺ IL-10⁺. Embora em menor proporção do que frente às CD4⁺, essas células também foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* [132]. Liu et al demonstraram que CTM aumentaram a expressão do fenótipo de células T CD8⁺ CD28⁻. O contato com CTM levou ao aumento da secreção de IL-10 e da expressão de FasL, aumentando sua capacidade supressora sobre os subtipos de células T CD4⁺, com indução de apoptose e diminuição de IFN-γ, *in vitro* [133]. A apoptose de células T como mecanismo de ação das CTM, induzida por FasL, também induz macrófagos a produzirem TGF-β, o qual induz a presença do fenótipo de células Treg [134]. *In vivo*, quando utilizada como terapia para doença do enxerto contra o hospedeiro crônica, foi detectável o aumento de células T CD8⁺ CD28⁻, mesmo após 3 meses da infusão [133].

Laranjeira et al analisaram a expressão de citocinas envolvidas na atividade imunossupressora das CTM sobre linfócitos T CD4 e CD8. CTM diminuem a frequência de células produtoras de TNF-α, IFN-γ e IL-2, mas são capazes de aumentar a expressão de receptor de IL-2, possivelmente como aumento de Treg [135] [136].

2.6 Microvessículas e imunossupressão

Células tronco mesenquimais vão além da secreção de citocinas, fatores de crescimento e contato entre as células para desempenhar sua função. Elas secretam grandes quantidades de nano e microvesículas (MV), tanto constitutivamente quanto sob atividade. Embora todas as formas de gênese, função e composição das MV ainda não seja plenamente elucidado, é muito claro seu papel

na comunicação celular dada a possibilidade de transferir proteínas e material genético [137]. MV de CTM apresentam microRNA (miRNA) e mRNA de genes relacionados ao desenvolvimento célula, a mecanismos de defesa para sobrevivência e potencial de diferenciação e supressão da regulação do sistema imune. A transferência de miRNA por MV de CTM para cultura de outras células foi capaz de suprimir alvos específicos, comprovando a funcionalidade das MV como um dos mecanismos utilizados pelas CTMs na modulação paracrina da função de outras células [138].

Kim et al foram pioneiros em identificar 730 proteínas nas MV de CTM. Destas, 420 proteínas foram associadas com a estrutura, formação e secreção das MV. Os autores identificaram 5 marcadores de células mesenquimais, CD13, CD29, CD44, CD73 e CD105 em suas membranas. Além disso, foram identificados receptores para PDGF e EGF; proteínas envolvidas em rotas de sinalização, como RAS-MAPK e RHO; proteínas de adesão e antígenos relacionados com a reparação tecidual [139] [140] .

Em modelo animal de dano renal, MV de CTM foram capazes de proteger o tecido e reverter a lesão e o miRNA associado com o processo de reparo e secreção de HGF foi isolado[135]. Em modelo de dano oxidativo neuronal, a exposição a baixas concentrações de MV de CTM resultou no aumento da viabilidade dos neurônios hipocâmpais revertendo o processo de morte neuronal associado ao dano, e aumentando o processo de re-mielinização. Interessantemente, os autores relatam que o efeito não foi dose dependente, sendo inclusive perdido em concentrações mais altas de MV [142]. Em modelo animal da doença do enxerto contra o hospedeiro resultante do transplante de células tronco hematopoéticas, Amarnath et al associaram o efeito curativo das CTM com a ação dos seus exossomas induzindo supressão de células Th1, além de diminuir a perfusão de linfócitos nos órgãos afetados e a secreção de TNF- α e IFN- γ [143].

Morshedi et al caracterizaram MV de CTM co-cultivadas com fração mononuclear de medula óssea. MV foram positivas para PD-L1, Gal-1 e TGF- β . Por outro lado, a co-cultura de linfócitos com MV de mesenquimais inibiu a proliferação e aumentou os níveis de IL-10, TGF- β e linfócitos Treg [144]. MV de CTM de tecido adiposo foram capazes de inibir a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺. Outros autores ainda demonstraram a capacidade de MV de modular a proliferação e a diferenciação de células B em plasmócitos [145] [146] .

Entretanto, Bernardo et al demonstraram que, embora as MV sozinhas sejam capazes de inibir a proliferação de linfócitos, esse efeito é mais potente quando é utilizada a própria CTM [147]. Então, embora ainda seja necessário determinar a melhor fonte terapêutica, MV são sem dúvida um mecanismo utilizado pelas CTM na regulação parácrina que exerce sobre a população linfoide. [148]

2.7 Fontes de CTM e Immunomodulação

O uso de fontes alternativas de CTM, frente a clássica obtenção pela medula óssea, é motivada por diversos fatores. O fato mais imperativo é a existência de tecidos candidatos como fontes viáveis, e eticamente justificáveis, serem diariamente descartados a partir de procedimentos comuns no hospital, como placenta ou lipoaspirado. Concomitantemente, temos conhecimento técnico que justifique pensar na possibilidade de fontes viáveis, principalmente através da digestão enzimática com colagenase tipo I ou tipo IV. A doação de medula, per se, é um processo invasivo e doloroso, que muitas vezes expõe o paciente a anestesia, e fontes como polpa de dentes decíduos contorna esse processo. Contudo, em defesa da CTM de medula, ela ainda é o padrão ouro e as novas fontes devem ser comparadas ao padrão terapêutico já estabelecido, adicionalmente pode-se utilizar os filtros que sobram (descartados) no processo de transplante de medula óssea [149]. Finalmente, a obtenção de CTM da MO de doadores saudáveis tem a conveniência de estes terem sido investigados quanto a presença de doenças infecciosas, inclusive a nível molecular; o que confere segurança na eventual utilização clínico-terapêutica das CTM.

CTM são excelentes para o uso clínico-terapêutico por diversos fatores: são facilmente acessíveis; pode-se atingir o volume de células necessário em pouco tempo, permitindo o uso autólogo se necessário ou o tratamento de vários pacientes com um única amostra, já que a expressão de antígenos do HLA é muito pobre permitindo a utilização destas células sem a necessidade da tipagem HLA, mais especificamente “*off the shelf*” ou seja, prontas para o uso em qualquer paciente. CTMs preservam suas características após congeladas o que permite a criação de bio-bancos e, finalmente, a terapia com CTM apresenta poucos efeitos adversos [76]. Contudo, os estudos que utilizam células mesenquimais valem-se da definição de critérios mínimos estabelecida pela ISCT. Isto estabelece o controle de qualidade

do tipo celular que está sendo trabalhado, mas é falho nas definições mais refinada de eficiência e/ou mecanismo de ação das diversas fontes possíveis.

Um dos primeiros trabalhos a elucidar possíveis diferenças funcionais das CTM obtidas de diversas fontes foi realizado por Blancher et al comparando CTMs de tecido adiposo e de medula óssea. Os autores não encontraram diferença no potencial inibitório das fontes sobre linfócitos T estimulados com mitógenos, OKT3, fitohemaglutinina ou concanavalina A. Quando os experimentos foram repetidos com fração mononuclear de medula, também não foram observadas diferenças. A única alteração foi o maior nível de IL-10 quando utilizadas células do tecido adiposo [150]. Por outro lado, Gabriel et al encontraram diferença na capacidade imunomodulatória quando compararam CTM de tecido adiposo e de membrana amniótica, principalmente dependendo do estímulo utilizado e concluíram que o tipo de estímulo e a qualidade das células presentes na co-cultura, criam *in vitro* um contexto único de citocinas, MV e outros mediadores químicos que afetam a função das células presentes naquele microambiente. Os autores demonstraram que IFN- γ aumenta a expressão de PDL-1 e PDL-2 em CTMs de tecido adiposo e que a melhor imunossupressão é diretamente proporcional aos níveis de IFN- γ e ao decréscimo da expressão de CD90, um marcador clássico de CTM [150].

Bieback et al compararam CTM de medula óssea (MO), cordão umbilical (CU) e tecido adiposo (AD) quanto a capacidade proliferativa. Os autores demonstraram que nas passagens iniciais, CTM de MO proliferam mais rapidamente [151] e que as derivadas de CB entram em senescência mais lentamente, favorecendo sua proliferação. Chang et al. demonstraram que a CTM de CU podem ser a melhor fonte supressora de secreção de IL-1 α , IL-6 e IL-8 em macrófagos, sugerindo com isto uma maior atividade imunossupressora [152]. Ainda e por outro lado, outros autores determinaram que CTM obtidas de AD parecem ser mais potentes na inibição da proliferação de linfócitos [153] [154].

Comparando CU, MO e CTM obtidas da membrana amniótica, Wegmeyer et al demonstraram diferenças na morfologia e tamanho das células derivadas da membrana amniótica, e que CU parecem ser a melhor quanto à secreção de HGF, embora sejam menos eficientes na secreção de VEGF. No mesmo estudo, após a análise de 371 genes associados com imunomodulação, regeneração, e "homing", os autores demonstraram as CTMs apresentam diferenças na expressão genica dependendo da fonte. Contudo, Cu e CTM de membrana amniótica apresentaram

mais mRNA de genes associados ao sistema imune, como IL-8, IL-1B, CXCL2, CXCL3, e TNF α , do que BM CTM [155].

Bagnara et al foram um dos primeiros autores a comparar CTM de polpa de dentes decíduos (PD) com as de MO. Os autores demonstraram que a proliferação das PD foi significativamente maior do que as de BM. Para comparar o efeito imunomodulador, os autores co-cultivaram CTM com células T purificadas, estimuladas com fitohemaglutinina. Células de PD foram mais eficientes em inibir a proliferação dos linfócitos [156].

Altaner et al compararam a expressão gênica de CTM de CU, PD, AD e MO. A análise de morfologia, de marcadores de caracterização e de 15 marcadores de multipotência não revelou diferenças entre as fontes, a exceção de CTM PD. Essas apresentaram maior expressão de proteínas de adesão (E-cadherin) e Sox2. Isso pode ser devido a diferença na origem embrionária dessa fonte, a qual pode conter elementos da crista neural na formação do embrião [157]

Então, células mesenquimais de fontes diferentes são capazes de influenciar as populações linfóides de modos diferentes. Comparando CU, AD e MO, quando estimuladas com fitohemaglutinina, todas as fontes costumam ser capazes de inibir a proliferação de linfócitos, contudo, AD apresenta maior indução do fenótipo de Treg. . CTMs derivadas de TA e MO quando em co-cultura com linfócitos B ou células NK estimuladas com fitohemaglutinina, diminuem a diferenciação em plasmócitos e a ativação de NK CD56^{bright}. Contudo, CTM derivadas de CB não foram capazes de inibir células B ou células NK [158][159].

Desse modo, é perceptível a variedade de resultados dispostos na literatura. Isso provavelmente deve-se a sensibilidade da célula mesenquimal, de modo que qualquer sutil alteração de no *milieu* de citocinas e tipos celulares envolvidos pode influenciar os resultados.

2.8 Terapia Celular e MSC

2.8.1 Histocompatibilidade e CTM

Uma das características melhor estabelecidas das células mesenquimais é apresentar HLA do tipo II, sendo uma fonte de terapia celular que não acarretará rejeição ou interações de histocompatibilidade. Le Blanc demonstrou que CTM exercem imunossupressão sobre células T por mecanismos independentes dos

complexos de histocompatibilidade, podendo ser transplantadas sem condicionamento prévio nem profilaxia de imunossupressão pós transplante, mesmo em casos alogênicos [160].

A via de administração da CTM afeta a forma a distribuição de células no tecido alvo, com a ressalva de que o efeito parácrino ainda existe como no caso de MV. Normalmente, utiliza-se duas formas de administração de células mesenquimais: a via intravenosa, utilizada nos casos de tratamento da doença do enxerto versus o hospedeiro (DECH), é a mais acessível pela facilidade da administração, mas não garante o “*homing*” da célula em outros tecidos alvo; a injeção direta no sítio de lesão, visando normalmente o efeito pontual e um menor número de células administradas. Normalmente a decisão sobre a forma de administração depende da característica da patologia e da possibilidade de acesso; cirrose (?), modelos de dano espinhal, úlceras e lesões de pele normalmente a aplicação das CTM é local, diretamente na lesão [161]

2.8.2 Suplementos de origem animal ou humano para culturas de CTM

Embora ainda seja relativamente aceito utilizar suplementos animais, como soro fetal bovino (SFB), a preocupação com possíveis efeitos colaterais levou ao desenvolvimento de materiais alternativos. Alguns são testados para nível clínico, “*xeno-free culture system*”, outros preferencialmente são produzidos com material humano, através de um concentrado (“pool”) de vários doadores, como no caso do lisado de plaquetas (LP). O LP é muito rico em fatores de crescimento, mitógenos e mediadores necessários para o desenvolvimento da célula, liberados pelos grânulos alfa das plaquetas no momento do preparo, a partir da estimulação com trombina ou da fragmentação dos grânulos durante ciclos de congelamento e descongelamento. Os grânulos alfa são ricos em *epidermal growth factors*, *basic fibroblast growth factor*, PDGFs, TGF- β 1, e IGF. O LP vem substituindo com sucesso o SFB em culturas de CTM para utilização clínica. [162] [163]

2.8.3 CTM e engenharia de tecidos

CTM mesenquimais foram primeiramente utilizadas em grau clínico em humanos há mais de 15 anos com o intuito de aprimorar a pega de CTH no

transplante de medula óssea. O papel regenerador ou facilitador da pega no enxerto de células tronco hematopoéticas aliado à inúmeras evidências de uma possível transdiferenciação *in vitro*, levaram à exploração da possibilidade da utilização das CTMs na engenharia de tecidos. No entanto, o crescente conhecimento sobre as propriedades das CTMs evidenciou que seu potencial imunomodulador, anti-inflamatório e de proteção/regeneração dos tecidos circundantes advem de suas propriedades parácrinas e não de seu potencial de transdiferenciação. Tais achados se basearam em inúmeros estudos pré-clínicos que resultaram na aplicação de CTMs para o tratamento da DECH (do inglês, GVHD “graft versus host disease”), com resultados animadores, sugerindo a possibilidade de investigar o seu papel na terapia para doenças autoimunes, como Crohn e outras [164] [165]

O transplante de células tronco hematopoiéticas, TCTH, (do inglês, HSCT “hematopoietic Stem cell transplantation”) é uma terapia curativa para muitas patologias hematológicas, sendo uma estratégia de tratamento para a leucemia desde a década de 1950 [166] [167]. Contudo, a quimioterapia agressiva necessária antes do transplante leva a altos danos que induzem no paciente a um estado de tempestade de citocina: altos níveis de moléculas de adesão, fatores co-estimulatórios e citocinas pró-inflamatórias circulantes. Além disso, lipopolisacarídeos (LPS) e o número e moléculas apresentados pelas células especializadas (APC) aumenta. Este estado estimula as células CD4⁺ CD8⁺ e NK presentes no enxerto, levando a DECH [168] [169] que, após a recidiva da doença é a maior causa de morbi-mortalidade no TCTH.

Le Blanc et al foram pioneiros quando utilizaram CTM com infusão intravenosa em um menino de 9 anos com grave DECH aguda resistente à corticoesteróides obtendo uma resposta completa sem reincidência, em 1 ano de “follow-up” [170]. Um estudo subsequente, publicado por Ringden et al, relataram resposta completa em 6 de 8 pacientes com DECH aguda severa tratados com CTM [171]. Desde então, vários autores demonstraram em estudos clínicos a eficácia de CTMs como terapêutica para DECH aguda resistente a esteróides, como demonstrado em revisão recente publicada pelo nosso grupo [157]

Lupus erimatoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, caracterizada por manifestações clínicas diversas que afetam vários órgãos do corpo. CTM de pacientes com LES apresentam defeitos funcionais e estruturais, fortalecendo ainda a possibilidade de terapia com CTM alogênicas [173]. Liang et al

relataram o tratamento de pacientes portadores de LES com CTM de BM ou de CB, com sobrevida geral de 94% em 27 meses de “follow-up”, sem observar diferenças entre as fontes; neste estudo, 50% dos pacientes entraram em remissão completa, 17% recaíram e 8 % foram refratários a terapia celular [174]. Sun e col. demonstraram que CTM de CB bloqueavam a proliferação de células T através da atividade da enzima IDO. Além disso, CTM elevaram Treg e impediram a diferenciação de células B em plasmócitos, diminuindo a produção de IgG. Complementarmente, os autores demonstraram que CTM de pacientes com LES não exibem atividade da enzima IDO, sendo incapazes de desempenhar o mecanismo de inibição de células T demonstrado pelas células alogênicas de CB [175].

A patogenia da doença inflamatória do trato gastrointestinal (DITGI) é complexa, envolvendo predisposição genética e fatores ambientais além das anormalidades do sistema imunológico. Na DITGI CTMs foram clinicamente testadas para duas indicações, doença fistulizante e doença luminal.

Na DITGI do tipo fistulizante, como na doença de Crohn, um estudo de fase I tratou a fístula com CTM AD autóloga 8 fístulas foram tratadas em 4 pacientes, as feridas fecharam em 8 semanas, sem a formação de abscessos ou outras complicações no follow-up de 2 anos [176]. Em um estudo de fase II, randomizado, com 49 pacientes, fistulas perianais foram tratadas com CTM e fibrina ou apenas fibrina aplicadas localmente. No braço tratado com CTM o fechamento das feridas foi observado em 71% dos pacientes, enquanto no braço controle a resposta foi observada em 16% dos pacientes. Em um estudo mais recente, 10 pacientes com doença de Crohn foram tratados com CTM de BM com aplicação intravenosa, com melhora nos sintomas em follow-up de 8 meses [177] [178]. Para doença do tipo luminal, a estratégia baseia-se mais no potencial imunossupressor do que no potencial de estimular a regeneração tecidual, como nas fístulas. Em um estudo incluindo 7 pacientes portadores de Crohn luminal a infusão endovenosa de CTM de BM ou CB alogênicas, 5 pacientes entraram em remissão completa, mas somente 2 não recaíram no follow-up de 2 anos [179]. Em outro estudo, incluindo 15 pacientes Crohn luminal, 8 pacientes atingiram remissão completa. [180]. A terapia com células mesenquimais apresenta poucos efeitos adversos. Duncan e col. realizaram uma metanálise sobre efeitos adversos de CTM autólogas e alogênicas cultivadas com soro bovino ou soro humano, criopreservadas ou não antes da

aplicação. O efeito mais presente e significativo estatisticamente foi febre no momento da infusão, curiosamente inclusive no grupo autólogo; embora sem associação estatística, a presença de DMSO em células criopreservadas ou material exógeno pode ter causado alergia e vômitos entre os sintomas.. Os outros parâmetros analisados foram infecção, transformação cancerígenas das células, problemas hematológicos, renais, hepáticos, neuronais ou pulmonares, sem efeito de associação significativa com o transplante de CTM. Embora, efeitos adversos relacionados a problemas pulmonares sejam presentes em alguns casos atingindo 13% dos pacientes em um dos estudos [181].

No momento da elaboração deste trabalho, a análise do *clinicaltrials.gov* revelou a presença de 248 estudos clínicos com CTM de MO, 78 com CTM de TA e somente 1 com CTM de PD.

3. Justificativa

A infusão de células mesenquimais vem se firmando como uma opção terapêutica para o tratamento da DECH aguda resistente ao tratamento padrão. Contudo, o potencial imunomodulador das CTMs obtidas de diferentes tecidos (MO, TA ou PD) é ainda controverso na literatura havendo necessidade de estudos adicionais no intuito de esclarecer se há diferenças no grau imunomodulador entre CTMs das diversas fontes.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Principal

Comparar a capacidade de imunomodulação de CTM obtidas de TA e PD com aquela observada em CTMs obtidas de MO.

4.2 Objetivos secundários

- Padronizar no centro de terapia celular o protocolo de obtenção de células mesenquimais a partir de lipoaspirado e dentes decíduos.

- Comparar a capacidade proliferativa de CTM de MO, TA e PD.
- Verificar o potencial das CTM de diferentes fontes na inibição da proliferação de linfócitos.
- Analisar como a co-cultura de CTM afeta a expressão dos subtipos de linfócitos.

5. Referências Bibliográficas

- [1] G. S. Woodhead, “The position of pathology among the biological sciences,” *J. Pathol. Bacteriol.*, vol. 1, no. 4, pp. 489–494, 1893.
- [2] J. E. Till and E. a. McCulloch, “A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells,” *Radiat. Res.*, vol. 14, no. 2, p. 213, Feb. 1961.
- [3] J. Rossant and P. P. L. Tam, “Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse.,” *Development*, vol. 136, pp. 701–713, 2009.
- [4] R. J. Cole, R. G. Edwards, and J. Paul, “Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit.,” *Dev. Biol.*, vol. 13, pp. 385–407, 1966.
- [5] G. Vogel, “Can old cells learn new tricks?,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 287, no. 5457, pp. 1418–1419, 2000.
- [6] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, and U. V Gerasimov, “Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.,” *Cell Tissue Kinet.*, vol. 20, no. 3, pp. 263–272, 1987.
- [7] A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina, “Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.,” *Exp. Hematol.*, vol. 4, no. 5, pp. 267–274, 1976.
- [8] U. A. Gurkan and O. Akkus, “The mechanical environment of bone marrow: a review.,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 12, pp. 1978–91, Dec. 2008.
- [9] C. Götherström, O. Ringdén, M. Westgren, C. Tammik, and K. Le Blanc, “Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells.,” *Bone Marrow Transplant.*, vol. 32, no. 3, pp. 265–272, 2003.

- [10] Y. Jang, Y. G. Koh, Y.-J. Choi, S.-H. Kim, D. S. Yoon, M. Lee, and J. W. Lee, "Characterization of adipose tissue-derived stromal vascular fraction for clinical application to cartilage regeneration," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, 2014.
- [11] R. F. Foronjy and S. M. Majka, "The Potential for Resident Lung Mesenchymal Stem Cells to Promote Functional Tissue Regeneration: Understanding Microenvironmental Cues," *Cells*, vol. 1, no. 4, pp. 874–885, 2012.
- [12] B. S. Snarr, C. B. Kern, and A. Wessels, "Origin and fate of cardiac mesenchyme," *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 10, pp. 2804–2819, 2008.
- [13] B. C. Perry, D. Zhou, X. Wu, F.-C. Yang, M. A. Byers, T.-M. G. Chu, J. J. Hockema, E. J. Woods, and W. S. Goebel, "Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use.," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 14, no. 2, pp. 149–156, 2008.
- [14] W. M. Jackson, L. J. Nesti, and R. S. Tuan, "Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells.," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 505–517, 2010.
- [15] H. E. Broxmeyer, "Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells," in *Essentials of Stem Cell Biology*, Elsevier Inc., 2009, pp. 151–156.
- [16] K. Kita, J. O. Lee, C. C. Finnerty, and D. N. Herndon, "Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion.," *Stem Cells Int.*, vol. 2011, p. 276193, 2011.
- [17] A. G. Via, A. Frizziero, and F. Oliva, "Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources.," *Muscles. Ligaments Tendons J.*, vol. 2, no. 3, pp. 154–62, 2012.
- [18] F. Dazzi, R. Ramasamy, S. Glennie, S. P. Jones, and I. Roberts, "The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis.," *Blood Rev.*, vol. 20, no. 3, pp. 161–71, May 2006.
- [19] E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, and A. Keating, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 5, pp. 393–395, 2005.
- [20] S. W. Lane, D. a Williams, and F. M. Watt, "Modulating the stem cell niche for tissue regeneration," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 795–803, Aug. 2014.
- [21] R. Schofield, "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell.," *Blood Cells*, vol. 4, no. 1–2, pp. 7–25, 1978.
- [22] A. Wabik and P. H. Jones, "Switching roles : the functional plasticity of adult tissue stem cells," pp. 1–17, 2015.

- [23] E. Fuchs and T. Chen, “A matter of life and death: self-renewal in stem cells.,” *EMBO Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 39–48, 2013.
- [24] A. Wilson, E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lió, H. R. MacDonald, and A. Trumpp, “Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair,” *Cell*, vol. 135, no. 6, pp. 1118–1129, 2008.
- [25] H. Ema and T. Suda, “Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity,” *Blood*. 2012.
- [26] S. K. Nilsson, H. M. Johnston, and J. a Coverdale, “Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells : inferences for the localization of stem cell niches Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells : inferences for the localization of stem cell niches,” vol. 97, no. 8, pp. 2293–2299, 2014.
- [27] R. S. Taichman, M. J. Reilly, R. S. Verma, K. Ehrenman, and S. G. Emerson, “Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors,” *Br. J. Haematol.*, vol. 112, no. 2, pp. 438–448, 2001.
- [28] Y. K. Jang, M. Kim, H. J. Jin, S. J. Choi, W. Oh, and Y.-H. Lee, “Cryopreserved cord blood progenitors and their cell adhesion molecules are increased by coculture with osteoblasts and parathyroid hormone.,” *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 35, no. 6, pp. e229–33, 2013.
- [29] M. Ilmer, M. Karow, C. Geissler, M. Jochum, and P. Neth, “Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells.,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 9, pp. 2397–2409, 2009.
- [30] L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden, “Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche,” pp. 841–846, 2003.
- [31] J. M. Weber, S. R. Forsythe, C. A. Christianson, B. J. Frisch, B. J. Gigliotti, C. T. Jordan, L. A. Milner, M. L. Guzman, and L. M. Calvi, “Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells,” *Bone*, vol. 39, no. 3, pp. 485–493, 2006.
- [32] B. C. Huber, “Impact of parathyroid hormone on bone marrow-derived stem cell mobilization and migration,” *World J. Stem Cells*, vol. 6, no. 5, p. 637, 2014.
- [33] D. Visnjic, Z. Kalajzic, D. W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo, and H. L. Aguila, “Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency,” *Blood*, vol. 103, no. 9, pp. 3258–3264, 2004.
- [34] S. Méndez-Ferrer, D. Lucas, M. Battista, and P. S. Frenette, “Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations.,” *Nature*, 2008.

- [35] S. Yamazaki, H. Ema, G. Karlsson, T. Yamaguchi, H. Miyoshi, S. Shioda, M. M. Taketo, S. Karlsson, A. Iwama, and H. Nakauchi, “Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche,” *Cell*, 2011.
- [36] J. P. Annes, J. S. Munger, and D. B. Rifkin, “Making sense of latent TGFbeta activation,” *J. Cell Sci.*, 2003.
- [37] W. Li, S. A. Johnson, W. C. Shelley, and M. C. Yoder, “Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells,” *Exp. Hematol.*, vol. 32, no. 12, pp. 1226–1237, 2004.
- [38] M. J. Kiel, Ö. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, and S. J. Morrison, “SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells,” *Cell*, 2005.
- [39] A. Greenbaum, Y.-M. S. Hsu, R. B. Day, L. G. Schuettpelez, M. J. Christopher, J. N. Borgerding, T. Nagasawa, and D. C. Link, “CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance,” *Nat.* 495, vol. 227, 2013.
- [40] A. Schajnovitz, T. Itkin, G. D’Uva, A. Kalinkovich, K. Golan, A. Ludin, D. Cohen, Z. Shulman, A. Avigdor, A. Nagler, O. Kollet, R. Seger, and T. Lapidot, “CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions,” *Nat. Immunol.*, 2011.
- [41] T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa, “Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches,” *Immunity*, 2006.
- [42] S. Méndez-Ferrer, T. V Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma’ayan, G. N. Enikolopov, and P. S. Frenette, “Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche,” *Nature*, vol. 466, no. 7308, pp. 829–834, 2010.
- [43] L. Ding and S. J. Morrison, “Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches,” *Nature*, vol. 495, no. 7440, pp. 231–5, 2013.
- [44] B. O. Zhou, R. Yue, M. M. Murphy, J. G. Peyer, and S. J. Morrison, “Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow,” *Cell Stem Cell*, vol. 15, pp. 154–168, 2014.
- [45] E. WERTHEIMER and B. SHAPIRO, “The physiology of adipose tissue,” *Physiol. Rev.*, vol. 28, no. 4, pp. 451–64, Oct. 1948.
- [46] M. Kouidhi, P. Villageois, C. M. Mounier, C. Ménigot, Y. Rival, D. Piwnica, J. Aubert, B. Chignon-Sicard, and C. Dani, “Characterization of Human Knee and Chin Adipose-Derived Stromal Cells,” *Stem Cells Int.*, vol. 2015, pp. 1–11, 2015.

- [47] R. L. R. Van, C. E. Bayliss, and D. A. K. Roncari, "Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture," *J. Clin. Invest.*, vol. 58, no. 3, pp. 699–704, 1976.
- [48] H. Hauner, G. Entenmann, M. Wabitsch, D. Gaillard, G. Ailhaud, R. Negrel, and E. F. Pfeiffer, "Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium.," *J. Clin. Invest.*, vol. 84, no. 5, pp. 1663–1670, 1989.
- [49] P. a Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, a J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick, "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 211–28, Apr. 2001.
- [50] J. B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble, "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers.," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 376–385, 2006.
- [51] G. Lin, M. Garcia, H. Ning, L. Banie, Y.-L. Guo, T. F. Lue, and C.-S. Lin, "Defining stem and progenitor cells within adipose tissue.," *Stem Cells Dev.*, vol. 17, pp. 1053–1063, 2008.
- [52] D. O. Traktuev, S. Merfeld-Clauss, J. Li, M. Kolonin, W. Arap, R. Pasqualini, B. H. Johnstone, and K. L. March, "A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks," *Circ. Res.*, vol. 102, pp. 77–85, 2008.
- [53] L. Zimmerlin, V. S. Donnenberg, M. E. Pfeifer, E. M. Meyer, B. Péault, J. P. Rubin, and A. D. Donnenberg, "Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue," *Cytom. Part A*, vol. 77, no. 1, pp. 22–30, 2010.
- [54] D. O. Traktuev, D. N. Prater, S. Merfeld-Clauss, A. R. Sanjeevaiah, M. R. Saadatzadeh, M. Murphy, B. H. Johnstone, D. a. Ingram, and K. L. March, "Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells," *Circ. Res.*, vol. 104, pp. 1410–1420, 2009.
- [55] W. Tang, D. Zeve, J. M. Suh, D. Bosnakovski, M. Kyba, R. E. Hammer, M. D. Tallquist, and J. M. Graff, "White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature.," *Science*, vol. 322, no. 5901, pp. 583–586, 2008.
- [56] M. M. Bekhite, A. Finkensieper, J. Rebhan, S. Huse, S. Schultze-Mosgau, H.-R. Figulla, H. Sauer, and M. Wartenberg, "Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells.," *Stem Cells Dev.*, vol. 23, no. 4, pp. 333–51, 2014.
- [57] J. R. Sarkanen, V. Kaila, B. Mannerstrom, S. Raty, H. Kuokkanen, S. Miettinen, and T. Ylikomi, "Human Adipose Tissue Extract Induces Angiogenesis and Adipogenesis In Vitro," *Tissue Eng. Part A*, vol. 18, no. 1–2, pp. 17–25, 2012.

- [58] Q. Q. Tang and M. D. Lane, "Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 81, pp. 715–736, 2012.
- [59] P. Trayhurn, "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity.," *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 1–21, 2013.
- [60] M. G. Valorani, E. Montelatici, A. Germani, A. Biddle, D. D'Alessandro, R. Strollo, M. P. Patrizi, L. Lazzari, E. Nye, W. R. Otto, P. Pozzilli, and M. R. Alison, "Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials," *Cell Prolif.*, vol. 45, no. 3, pp. 225–238, 2012.
- [61] C. Fotia, A. Massa, F. Boriani, N. Baldini, and D. Granchi, "Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells," *Cytotechnology*, 2014.
- [62] A. Jiang, M. Li, W. Duan, Y. Dong, and Y. Wang, "Improvement of the Survival of Human Autologous Fat Transplantation by Adipose-Derived Stem-Cells-Assisted Lipotransfer Combined with bFGF," *Sci. World J.*, vol. 2015, pp. 1–7, 2015.
- [63] W.-P. Tang, T. Akahoshi, J.-S. Piao, S. Narahara, M. Murata, T. Kawano, N. Hamano, I. Tetsuo, and M. Hashizume, "Basic FGF-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion ameliorate liver cirrhosis via paracrine HGF," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, p. n/a–n/a, 2015.
- [64] P. M. Butler, "Ontogenetic aspects of dental evolution," *International Journal of Developmental Biology*, vol. 39, no. 1. pp. 25–34, 1995.
- [65] N. W. Blackstone, "Charles Manning Child (1869-1954): the past, present, and future of metabolic signaling.," *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.*, vol. 306, no. April, pp. 1–7, 2006.
- [66] A. R. R. I. On, "Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering," vol. 67, pp. 251–267, 2015.
- [67] S. Daud, P. Nambiar, M. Z. Hossain, M. R. A. Rahman, and M. M. Bakri, "Changes in cell density and morphology of selected cells of the ageing human dental pulp," *Gerodontology*, p. n/a–n/a, 2014.
- [68] F. Chmilewsky, C. Jeanneau, P. Laurent, and I. About, "LPS Induces Pulp Progenitor Cell Recruitment via Complement Activation," *J. Dent. Res.*, vol. 94, pp. 166–174, 2014.
- [69] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey, and S. Shi, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 25, pp. 13625–30, Dec. 2000.
- [70] S. Yildirim, M. Yapar, U. Sermet, K. Sener, and A. Kubar, "The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 105, no. 1, pp. 113–120, 2008.

- [71] Y. Zhu, L. Shang, X. Chen, X. Kong, N. Liu, Y. Bai, J. Fang, J. Dang, X. Wang, and Y. Jin, "Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption," *J. Cell. Physiol.*, vol. 228, no. May, pp. 207–215, 2013.
- [72] Ş. Şimşek and L. Durutürk, "A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption," *Arch. Oral Biol.*, vol. 50, pp. 461–468, 2005.
- [73] M. Fitzgerald, D. J. Chiego, and D. R. Heys, "Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth.," *Arch. Oral Biol.*, vol. 35, pp. 707–715, 1990.
- [74] G. Akpınar, M. Kasap, A. Aksoy, G. Duruksu, G. Gacar, and E. Karaoz, "Phenotypic and Proteomic Characteristics of Human Dental Pulp Derived Mesenchymal Stem Cells from a Natal , an Exfoliated Deciduous , and an Impacted Third Molar Tooth," vol. 2014, 2014.
- [75] H.-R. Aghayan, P. Goodarzi, and B. Arjmand, *Stem Cells and Good Manufacturing Practices*, vol. 1283. New York, NY: Springer New York, 2015.
- [76] B. Parekkadan and J. J. Milwid, "Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 12, pp. 87–117, 2010.
- [77] D. Zipori, "The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional.," *Stem Cells*, vol. 23, no. 6, pp. 719–26, Jan. .
- [78] W. Li, G. Ren, Y. Huang, J. Su, Y. Han, J. Li, X. Chen, K. Cao, Q. Chen, P. Shou, L. Zhang, Z.-R. Yuan, a I. Roberts, S. Shi, a D. Le, and Y. Shi, "Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses," *Cell Death Differ.*, vol. 19, no. 9, pp. 1505–1513, 2012.
- [79] A. Sica and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 3, pp. 787–95, Mar. 2012.
- [80] B. Chazaud, "Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration," *Immunobiology*, vol. 219, pp. 172–178, 2014.
- [81] A. Chow, D. Lucas, A. Hidalgo, S. Méndez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P. S. Frenette, "Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche.," *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 2, pp. 261–71, Feb. 2011.
- [82] C. Shi, T. Jia, S. Mendez-Ferrer, T. M. Hohl, N. V. Serbina, L. Lipuma, I. Leiner, M. O. Li, P. S. Frenette, and E. G. Pamer, "Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands," *Immunity*, vol. 34, no. 4, pp. 590–601, 2011.

- [83] L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu, Y. Wu, and Y. Wu, "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing," *PLoS One*, vol. 3, no. 4, 2008.
- [84] D.-I. Cho, M. R. Kim, H. Jeong, H. C. Jeong, M. H. Jeong, S. H. Yoon, Y. S. Kim, and Y. Ahn, "Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages.," *Exp. Mol. Med.*, vol. 46, no. 1, p. e70, 2014.
- [85] P.-M. Chen, K.-J. Liu, P.-J. Hsu, C.-F. Wei, C.-H. Bai, L.-J. Ho, H.-K. Sytwu, and B. L. Yen, "Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 96, no. 35, pp. 295–303, 2014.
- [86] L. Raffaghello, G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Montecucco, A. Busca, F. Dallegri, L. Ottonello, and V. Pistoia, "Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche.," *Stem Cells*, vol. 26, pp. 151–162, 2008.
- [87] M. a. Cassatella, F. Mosna, A. Micheletti, V. Lisi, N. Tamassia, C. Cont, F. Calzetti, M. Pelletier, G. Pizzolo, and M. Krampera, "Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils," *Stem Cells*, vol. 29, pp. 1001–1011, 2011.
- [88] S. Brandau, M. Jakob, K. Bruderek, F. Bootz, B. Giebel, S. Radtke, K. Mauel, M. Jäger, S. B. Flohé, and S. Lang, "Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e106903, 2014.
- [89] S. Brandau, M. Jakob, H. Hemeda, K. Bruderek, S. Janeschik, F. Bootz, and S. Lang, "Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 88, no. 5, pp. 1005–15, Nov. 2010.
- [90] S. C. Hsu, L. T. Wang, C. L. Yao, H. Y. Lai, K. Y. Chan, B. S. Liu, P. Chong, O. K. S. Lee, and H. W. Chen, "Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4⁺ CD45RO⁺ T cells," *Immunobiology*, vol. 218, no. 1, pp. 90–95, 2013.
- [91] H. H. Sciences, B. I. Deaconess, G. Hospital, A. Industrial, and S. J. Tong, "T ISSUE - SPECIFIC STEM CELLS Intravital Imaging of Mesenchymal Stem Cell Trafficking and Association With Platelets and," pp. 265–277, 2015.
- [92] S.-X. Cai, T.-S. Lai, and Z.-H. Wang, "Mesenchymal Stem Cell Attenuates Neutrophil-predominant Inflammation and Acute Lung Injury in an In Vivo Rat Model of Ventilator-induced Lung Injury," *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 128, no. 3, p. 361, 2015.
- [93] G. Gri, B. Frossi, F. D’Inca, L. Danelli, E. Betto, F. Mion, R. Sibilano, and C. Pucillo, "Mast cell: An emerging partner in immune interaction," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. May, pp. 1–11, 2012.

- [94] A. Rigoni, M. P. Colombo, and C. Pucillo, "The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment," *Cancer Microenviron.*, Sep. 2014.
- [95] H.-S. Kim, J.-W. Yun, T.-H. Shin, S.-H. Lee, B.-C. Lee, K.-R. Yu, Y. Seo, S. Lee, T.-W. Kang, S. W. Choi, K.-W. Seo, and K.-S. Kang, "Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell-Derived PGE 2 and TGF- β 1 Alleviate Atopic Dermatitis by Reducing Mast Cell Degranulation," *Stem Cells*, vol. 33, no. 4, pp. 1254–1266, Apr. 2015.
- [96] N. Hirota, S. McCuaig, M. J. O'Sullivan, and J. G. Martin, "Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells," *Stem Cell Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 599–609, 2014.
- [97] W. Su, Q. Wan, J. Huang, L. Han, X. Chen, G. Chen, N. Olsen, S. G. Zheng, and D. Liang, "Culture medium from TNF- α -stimulated mesenchymal stem cells attenuates allergic conjunctivitis through multiple antiallergic mechanisms," *J. Allergy Clin. Immunol.*, Feb. 2015.
- [98] L. Martinet and M. J. Smyth, "Balancing natural killer cell activation through paired receptors," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 155, no. March, pp. 1–12, 2015.
- [99] C. J. Denman, V. V. Senyukov, S. S. Somanchi, P. V. Phatarpekar, L. M. Kopp, J. L. Johnson, H. Singh, L. Hurton, S. N. Maiti, M. H. Huls, R. E. Champlin, L. J. N. Cooper, and D. A. Lee, "Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells.," *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e30264, Jan. 2012.
- [100] K. S. Campbell and J. Hasegawa, "Natural killer cell biology: an update and future directions.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 132, no. 3, pp. 536–44, Sep. 2013.
- [101] L. L. Lanier, A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken, and J. H. Phillips, "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes.," *J. Immunol.*, vol. 136, no. 12, pp. 4480–6, Jun. 1986.
- [102] M. A. Cooper, T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri, "The biology of human natural killer-cell subsets.," *Trends Immunol.*, vol. 22, no. 11, pp. 633–40, Nov. 2001.
- [103] N. Anfossi, P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Breso, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagné, S. Ugolini, and E. Vivier, "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I.," *Immunity*, vol. 25, no. 2, pp. 331–42, Aug. 2006.
- [104] G. M. Spaggiari and L. Moretta, "Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity.," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 91, no. 1, pp. 27–31, 2013.
- [105] M. J. Crop, S. S. Korevaar, R. De Kuiper, J. N. M. Ijzermans, N. M. Van Besouw, C. C. Baan, W. Weimar, and M. J. Hoogduijn, "Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8 + T-cells and NK cells," *Cell Transplant.*, vol. 20, no. 35, pp. 1547–1559, 2010.

- [106] H. Thomas, M. Jäger, K. Mauel, S. Brandau, S. Lask, and S. B. Flohé, “Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhanced IL-12/IL-18-induced interferon-gamma secretion,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, no. Dc, p. 143463, Jan. 2014.
- [107] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, “Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation,” *Blood*, vol. 107, no. 4, pp. 1484–90, Feb. 2006.
- [108] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, “Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2,” *Blood*, vol. 111, no. 3, pp. 1327–33, Feb. 2008.
- [109] D. Chatterjee, N. Marquardt, D. Tufa, G. Beauclair, H. Low, T. Hatlapatka, R. Hass, C. Kasper, C. von Kaisenberg, R. Schmidt, and R. Jacobs, “Role of gamma-secretase in human umbilical-cord derived mesenchymal stem cell mediated suppression of NK cell cytotoxicity,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 12, no. 1, p. 63, 2014.
- [110] A. Pradier, J. Passweg, J. Villard, and V. Kindler, “Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity,” *Cell Transplant.*, vol. 20, no. 5, pp. 681–691, 2011.
- [111] C. R. Almeida, D. P. Vasconcelos, R. M. Goncalves, and M. a. Barbosa, “Enhanced mesenchymal stromal cell recruitment via natural killer cells by incorporation of inflammatory signals in biomaterials,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 67, pp. 261–271, 2012.
- [112] M. B. Centre, P. Hospital, B. Hospital, and K. Bicetre, “TRANSLATIONAL AND CLINICAL TLR Ligands Stimulation Protects MSC from NK Killing,” no. 88, pp. 290–300, 2014.
- [113] Y. Li, Y. H. Qu, Y. F. Wu, X. P. Wang, J. Wei, W. G. Huang, D. H. Zhou, J. Fang, K. Huang, and S. L. Huang, “Bone marrow mesenchymal stem cells reduce the antitumor activity of cytokine-induced killer/natural killer cells in K562 NOD/SCID mice,” *Ann. Hematol.*, vol. 90, no. 8, pp. 873–885, 2011.
- [114] A. Jewett, Y.-G. Man, and H.-C. Tseng, “Dual functions of natural killer cells in selection and differentiation of stem cells; role in regulation of inflammation and regeneration of tissues,” *J. Cancer*, vol. 4, no. 1, pp. 12–24, Jan. 2013.
- [115] F. Broere, S. G. Apasov, M. V Sitkovsky, and W. Van Eden, “Principles of Immunopharmacology,” *Princ. Immunopharmacol.*, pp. 15–28, 2011.
- [116] D. L. Farber, N. a Yudanin, and N. P. Restifo, “Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 1, pp. 24–35, 2014.

- [117] M. Krampera, S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson, and F. Dazzi, "Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide.," *Blood*, vol. 101, no. 9, pp. 3722–9, May 2003.
- [118] M. Di Nicola, C. Carlo-stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, S. Grisanti, A. M. Gianni, and P. Matteucci, "induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli," vol. 99, no. 10, pp. 3838–3843, 2013.
- [119] M. E. Quaedackers, C. C. Baan, W. Weimar, and M. J. Hoogduijn, "Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 12, pp. 3436–3446, 2009.
- [120] A. Augello, R. Tasso, S. M. Negrini, A. Amateis, F. Indiveri, R. Cancedda, and G. Pennesi, "Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway," *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, no. 5, pp. 1482–1490, 2005.
- [121] K. Le Blanc and D. Mougiakakos, "Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 5, pp. 383–96, May 2012.
- [122] S. Glennie, P. J. Dyson, E. W. Lam, and F. Dazzi, "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells," *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2821–2827, 2005.
- [123] H. Sheng, Y. Wang, Y. Jin, Q. Zhang, Y. Zhang, L. Wang, B. Shen, S. Yin, W. Liu, L. Cui, and N. Li, "A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1.," *Cell Res.*, vol. 18, no. 8, pp. 846–57, Aug. 2008.
- [124] M. M. Duffy, J. Pindjakova, S. a. Hanley, C. McCarthy, G. a. Weidhofer, E. M. Sweeney, K. English, G. Shaw, J. M. Murphy, F. P. Barry, B. P. Mahon, O. Belton, R. Ceredig, and M. D. Griffin, "Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 10, pp. 2840–2851, 2011.
- [125] Y. Y. Wan and R. a. Flavell, "How diverse-CD4 effector T cells and their functions," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 20–36, 2009.
- [126] J.-H. Lim, J.-S. Kim, I.-H. Yoon, J.-S. Shin, H.-Y. Nam, S.-H. Yang, S.-J. Kim, and C.-G. Park, "Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node.," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 7, pp. 4022–4029, 2010.
- [127] S. Pianta, P. Bonassi Signoroni, I. Muradore, M. F. Rodrigues, D. Rossi, A. Silini, and O. Parolini, "Amniotic Membrane Mesenchymal Cells-Derived Factors Skew T Cell Polarization Toward Treg and Downregulate Th1 and Th17 Cells Subsets," *Stem Cell Rev. Reports*, 2014.

- [128] Y. Zhang, W. Cai, Q. Huang, Y. Gu, Y. Shi, J. Huang, F. Zhao, Q. Liu, X. Wei, M. Jin, C. Wu, Q. Xie, Y. Zhang, B. Wan, and Y. Zhang, “Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells,” *Hepatology*, vol. 59, no. 2, pp. 671–682, 2014.
- [129] C. Yang, J. Li, H. Lin, K. Zhao, and C. Zheng, “Nasal Mucosa Derived-Mesenchymal Stem Cells from Mice Reduce Inflammation via Modulating Immune Responses,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0118849, 2015.
- [130] M. M. Duffy, T. Ritter, R. Ceredig, and M. D. Griffin, “Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 2, no. 4, p. 34, 2011.
- [131] K. English, J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, and B. P. Mahon, “Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 156, no. 1, pp. 149–160, 2009.
- [132] C. Prevosto, M. Zancolli, P. Canevali, M. R. Zocchi, and A. Poggi, “Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction,” *Haematologica*, vol. 92, no. 7, pp. 881–888, 2007.
- [133] Q. Liu, H. Zheng, X. Chen, Y. Peng, W. Huang, X. Li, G. Li, W. Xia, Q. Sun, and A. Peng Xiang, “Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8+CD28– regulatory T cells,” *Cell. Mol. Immunol.*, no. October, pp. 1–11, 2014.
- [134] K. Akiyama, C. Chen, D. Wang, X. Xu, C. Qu, T. Yamaza, T. Cai, W. Chen, L. Sun, and S. Shi, “Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis,” *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 544–555, 2012.
- [135] P. Laranjeira, M. Pedrosa, S. Pedreiro, J. Gomes, A. Martinho, B. Antunes, T. Ribeiro, F. Santos, H. Trindade, and A. Paiva, “Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive , memory and effector T cells,” vol. 6, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [136] I. Rasmusson, O. Ringdén, B. Sundberg, and K. Le Blanc, “Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms,” *Exp. Cell Res.*, vol. 305, no. 1, pp. 33–41, 2005.
- [137] J. Ratajczak, K. Miekus, M. Kucia, J. Zhang, R. Reza, P. Dvorak, and M. Z. Ratajczak, “Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery,” *Leukemia*, vol. 20, no. 5, pp. 847–56, May 2006.
- [138] F. Collino, M. C. Deregibus, S. Bruno, L. Sterpone, G. Aghemo, L. Viltono, C. Tetta, and G. Camussi, “Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs,” *PLoS One*, vol. 5, no. 7, 2010.

- [139] H.-S. Kim, D.-Y. Choi, S. J. Yun, S.-M. Choi, J. W. Kang, J. W. Jung, D. Hwang, K. P. Kim, and D.-W. Kim, "Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 839–49, 2012.
- [140] S. R. Baglio, D. M. Pegtel, and N. Baldini, "Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy," *Front. Physiol.*, vol. 3 SEP, no. September, pp. 1–11, 2012.
- [141] S. Bruno, C. Grange, M. C. Deregibus, R. a Calogero, S. Saviozzi, F. Collino, L. Morando, A. Busca, M. Falda, B. Bussolati, C. Tetta, and G. Camussi, "Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1053–1067, 2009.
- [142] A. Farinazzo, E. Turano, S. Marconi, E. Bistaffa, E. Bazzoli, and B. Bonetti, "Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotective and neuroregenerative approaches," *Cytotherapy*, no. January, 2015.
- [143] S. Amarnath, J. E. Foley, D. E. Farthing, R. E. Gress, A. Laurence, M. a. Eckhaus, J.-Y. Métais, J. J. Rose, F. T. Hakim, T. C. Felizardo, A. V. Cheng, P. G. Robey, D. E. Stroncek, M. Sabatino, M. Battiwalla, S. Ito, D. H. Fowler, and A. J. Barrett, "Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells Harness Purinergic Signaling to Tolerize Human Th1 Cells In Vivo," *Stem Cells*, p. n/a–n/a, 2014.
- [144] A. Mokarizadeh, N. Delirezh, A. Morshedi, G. Mosayebi, A. A. Farshid, and K. Mardani, "Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling," *Immunol. Lett.*, vol. 147, no. 1–2, pp. 47–54, 2012.
- [145] R. Blazquez, F. M. Sanchez-Margallo, O. de la Rosa, W. Dalemans, V. Ñ • Lvarez, R. Tarazona, and J. G. Casado, "Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. November, pp. 1–9, 2014.
- [146] M. Budoni, A. Fierabracci, R. Luciano, S. Petrini, V. Di Ciommo, and M. Muraca, "The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles," *Cell Transplant.*, vol. 22, no. 2, pp. 369–379, 2013.
- [147] A. Conforti, M. Scarsella, N. Starc, E. Giorda, S. Biagini, A. Proia, R. Carsetti, F. Locatelli, and M. E. Bernardo, "Microvesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells Are Not as Effective as Their Cellular Counterpart in the Ability to Modulate Immune Responses In Vitro.," *Stem Cells Dev.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–9, 2014.
- [148] A. Fierabracci, A. Del Fattore, R. Luciano, M. Muraca, A. Teti, and M. Muraca, "Recent Advances in Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation. the Role of Microvesicles.," *Cell Transplant.*, vol. 24, no. 80, pp. 1–53, 2013.
- [149] R. Haddad and F. Saldanha-Araujo, "Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: What do we know so far?," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.

- [150] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, and A. Blancher, "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells.," *Br. J. Haematol.*, vol. 129, no. 1, pp. 118–29, Apr. 2005.
- [151] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.," *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1294–1301, 2006.
- [152] H. Jin, Y. Bae, M. Kim, S.-J. Kwon, H. Jeon, S. Choi, S. Kim, Y. Yang, W. Oh, and J. Chang, "Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 17986–18001, 2013.
- [153] M. Najar, G. Raicevic, H. Fayyad-Kazan, C. De Bruyn, D. Bron, M. Toungouz, and L. Lagneaux, "Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 15, no. 4, pp. 693–702, Apr. 2013.
- [154] S. M. Melief, J. J. Zwaginga, W. E. Fibbe, and H. Roelofs, "Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts.," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 2, no. 6, pp. 455–63, 2013.
- [155] H. Wegmeyer, A.-M. Bröske, M. Leddin, K. Kuentzer, A. K. Nisslbeck, J. Hupfeld, K. Wiechmann, J. Kuhlen, C. von Schwerin, C. Stein, S. Knothe, J. Funk, R. Huss, and M. Neubauer, "Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin.," *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 19, pp. 2606–18, Oct. 2013.
- [156] L. Pierdomenico, L. Bonsi, M. Calvitti, D. Rondelli, M. Arpinati, G. Chirumbolo, E. Becchetti, C. Marchionni, F. Alviano, V. Fossati, N. Staffolani, M. Franchina, A. Grossi, and G. P. Bagnara, "Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive Activity Can Be Easily Isolated from Dental Pulp," *Transplantation*, vol. 80, no. 6, pp. 836–842, Sep. 2005.
- [157] P. Stanko, K. Kaiserova, V. Altanero, and C. Altaner, "Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression.," *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, no. August, Oct. 2013.
- [158] A. Ribeiro, P. Laranjeira, S. Mendes, I. Velada, C. Leite, P. Andrade, F. Santos, A. Henriques, M. Grãos, C. M. P. Cardoso, A. Martinho, M. Pais, C. L. da Silva, J. Cabral, H. Trindade, and A. Paiva, "Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells.," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, no. 5, p. 125, Jan. 2013.
- [159] G. Raicevic, M. Najar, B. Stamatopoulos, C. De Bruyn, N. Meuleman, D. Bron, M. Toungouz, and L. Lagneaux, "The source of human mesenchymal stromal cells

- influences their TLR profile as well as their functional properties.," *Cell. Immunol.*, vol. 270, no. 2, pp. 207–16, Jan. 2011.
- [160] K. Le Blanc, L. Tammki, B. Sundberg, S. E. Haynesworth, and O. Ringden, "Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic response independently of the major histocompatibility complex," *Scand J Immunol*, vol. 57, pp. 11–20, 2003.
- [161] X. Wei, X. Yang, Z. Han, F. Qu, L. Shao, and Y. Shi, "Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy.," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 34, no. 6, pp. 747–54, 2013.
- [162] L. Silla, V. Valim, B. Amorin, A. P. Alegretti, F. Dos Santos de Oliveira, M. A. Lima da Silva, A. Dahmer, N. Emerim Lemos, M. A. Mentz Albrecht, Á. Macedo Laureano, C. Bonfim, L. Moraes Júnior, A. Pezzi, L. Baggio, C. A. M. Albrecht, M. Capra, L. Fogliatto, L. Della Costa Rigoni, G. Fischer, A. Paz, and L. Esteves Daudt, "A safety and feasibility study with platelet lysate expanded bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of acute graft-versus-host disease in Brazil.," *Leuk. Lymphoma*, vol. 55, no. 5, pp. 1203–5, May 2014.
- [163] R. R. Sharma, K. Pollock, A. Hubel, and D. McKenna, "Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices," *Transfusion*, vol. 54, no. 5, pp. 1418–1437, 2014.
- [164] A. Tyndall, "Successes and failures of stem cell transplantation in autoimmune diseases.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2011, pp. 280–4, Jan. 2011.
- [165] a Tyndall and a Uccelli, "Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks.," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 43, no. 11, pp. 821–8, Jun. 2009.
- [166] M. Bacarani, G. Saglio, J. Goldman, A. Hochhaus, B. Simonsson, F. Appelbaum, J. Apperley, F. Cervantes, J. Cortes, M. Deininger, A. Gratwohl, F. Guilhot, M. Horowitz, T. Hughes, H. Kantarjian, R. Larson, D. Niederwieser, R. Silver, and R. Hehlmann, "Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.," *Blood*, vol. 108, no. 6, pp. 1809–20, Sep. 2006.
- [167] E. D. Thomas, H. L. Lochte, J. H. Cannon, O. D. Sahler, and J. W. Ferrebee, "Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man.," *J. Clin. Invest.*, vol. 38, pp. 1709–16, Oct. 1959.
- [168] G. R. Hill and J. L. Ferrara, "The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation.," *Blood*, vol. 95, no. 9, pp. 2754–9, May 2000.
- [169] G. Socié and B. R. Blazar, "Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside.," *Blood*, vol. 114, no. 20, pp. 4327–36, Nov. 2009.

- [170] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Götherström, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringdén, "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells," *Lancet*, vol. 363, no. 9419, pp. 1439–1441, 2004.
- [171] O. Ringdén, M. Uzunel, I. Rasmusson, M. Remberger, B. Sundberg, H. Lönnies, H.-U. Marschall, A. Dlugosz, A. Szakos, Z. Hassan, B. Omazic, J. Aschan, L. Barkholt, and K. Le Blanc, "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease," *Transplantation*, vol. 81, no. 10, pp. 1390–1397, 2006.
- [172] B. Amorin, A. P. Alegretti, V. Valim, A. Pezzi, A. M. Laureano, M. A. L. da Silva, A. Wieck, and L. Silla, "Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review," *Hum. Cell*, 2014.
- [173] L. Y. Sun, H. Y. Zhang, X. B. Feng, Y. Y. Hou, L. W. Lu, and L. M. Fan, "Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus," *Lupus*, vol. 16, no. 2, pp. 121–8, Jan. 2007.
- [174] D. Wang, H. Zhang, J. Liang, X. Li, X. Feng, H. Wang, B. Hua, B. Liu, L. Lu, G. S. Gilkeson, R. M. Silver, W. Chen, S. Shi, and L. Sun, "Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years experience," *Cell Transpl.*, vol. 22, pp. 2267–2277, 2012.
- [175] D. Wang, X. Feng, L. Lu, J. E. Konkel, H. Zhang, Z. Chen, X. Li, X. Gao, L. Lu, S. Shi, W. Chen, and L. Sun, "A CD8 T cell-IDO axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human SLE," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 66, no. 8, pp. 2234–2245, 2014.
- [176] D. García-Olmo, M. García-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro, and J. A. Rodríguez-Montes, "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation," *Dis. Colon Rectum*, vol. 48, no. 7, pp. 1416–23, Jul. 2005.
- [177] J. Voswinkel, S. Francois, J. M. Simon, M. Benderitter, N. C. Gorin, M. Mohty, L. Fouillard, and A. Chapel, "Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: A comprehensive review," *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, vol. 45, no. 2, pp. 180–192, 2013.
- [178] J. Voswinkel, S. Francois, N. C. Gorin, and A. Chapel, "Gastro-intestinal autoimmunity: Preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells," *Immunol. Res.*, vol. 56, no. 2–3, pp. 241–248, 2013.
- [179] J. Liang, H. Zhang, D. Wang, X. Feng, H. Wang, B. Hua, B. Liu, and L. Sun, "Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease," *Gut*, vol. 61, no. 3, pp. 468–469, 2012.
- [180] G. M. Forbes, M. J. Sturm, R. W. Leong, M. P. Sparrow, D. Segarajasingam, A. G. Cummins, M. Phillips, and R. P. Herrmann, "A phase 2 study of allogeneic

- mesenchymal stromal cells for luminal crohn's disease refractory to biologic therapy," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 1, pp. 64–71, 2014.
- [181] M. M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese, D. Fergusson, B. W. Winston, J. C. Marshall, J. Granton, and D. J. Stewart, "Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012.

6.Artigo científico

Adipocyte derived mesenchymal stromal cell and platelet lysate: ideal cell and supplement for the treatment of immune-inflammatory diseases?

Rodrigues F, Amorin B, Silla L

Abstract

Background: Mesenchymal stromal cells (MSC) are been tested for the treatment of immune diseases. MSC are present in several adult tissues which milieu may influence MSC behavior particularly under inflammatory conditions. Additionally, culture conditions also can modify cell function or state of activation. Methods: To address the influence of the MSC source on its characteristics, we studied a xenofree, platelet lysate supplemented MSC from dental pulp, adipose tissue and bone marrow, co-cultured with isolated T cells and PBMC subset, and studied the effect of culture animal or human supplements immunomodulatory effect. Results: All three sources were efficient in inhibiting T cells. Among all MSC sources, as also described by others, adipose MSC were capable to significantly induce Treg phenotype and decrease T CD8⁺. Furthermore, comparing fetal bovine serum and platelet lysate, results demonstrate that platelet lysate alone is capable to induce immunomodulatory phenotype. Additional studies have to be made to elucidate the PL immunomodulatory effect.

Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSC) are a specialized adult stem cell type of mesodermal origin. First identified by Friednstein [1] [2] in fibroblasts colony forming units from the bone marrow (BM), these cells are plastic adherent and capable of differentiation in chondrocyte, osteocytes and adipocytes. After its discovery BM MSC regenerative potential has been explored in pre-clinical and clinical studies focusing in trans-differentiation and tissue engineering [3]. An increasing number of evidences, however, pointed to a regenerative and immunomodulatory role mediated

by cell-to-cell contact and paracrine effects mediated by cytokines, growth factors, and exosomes[4][5]. Apparent, MSC are microenvironment modulators that respond to small stimuli to maintain tissue homeostasis. MSC have been identified in most of the adult tissues, like liver; adipose tissue; lungs; heart; dental pulp; muscle; cord blood; placenta, synovial membrane and tendons [6]

Alternatives to BM MSC have been explored particularly outside the setting of bone marrow transplantation, and usually discarded tissue sources became an attractive option. Lipoaspirate, placenta, umbilical cord blood, umbilical cord, and teeth are amongst discarded tissue studied the most [7]. The role of the MSC source on its regenerative and immunomodulation effects, have been studied and although adipocyte derived MSC appears to have a higher proliferative and immunomodulatory potential there still have conflicting results concerning the role of MSC source [8].

Concerns about xenoreactions to fetal calf serum supplemented cultured cells for cellular therapy, led our group [9] and others [10] to explore human derived supplements. As shown in our previous study, in platelet lysate (PL) supplemented cultures, MSC proliferate significantly better than when cultured with FCS [9]. Along with a higher proliferative index PL could also alter MSC characteristics. and its efficacy, leading to concerns about using fetal bovine serum and other non-human materials, evidence ensuring this is that MSC proliferate better using human derived materials, like platelet lysate (LP). As a strategy to consolidate human alternatives, this study was conducted using LP as culture supplement.

MSCs from different origins have common nomenclature and characterization as stated by the International Society for Cellular Therapy [11]. The possibility that MSC from different sources can induce distinct immunomodulatory profiles is not yet entirely clear [12]. Through cell contact and paracrine mechanisms several types of immune cells are regulated by MSCs. According to the desired effect in its clinical application, the definition of the best MSC source type is important in order to enhance therapeutic benefits. In the present study we explored the immunomodulatory effect of MSC from dental pulp of human exfoliated deciduous teeth (SHED), adipose tissue (AD) and bone marrow (BM) with PBMC and

magnetically isolated T lymphocytes, as well as the possible effect that FCS and PL supplements can affect MSC behavior.

Material and Methods

Isolation, expansion and characterization of Mesenchymal stromal cells

Mesenchymal stromal cells were collected after donor agreement and informed consent, according to the local ethical committee. MSC were cultured with DMEM low glucose (Gibco, Invitrogen Corp., USA), 1% PENSTREP (Gibco, Invitrogen Corp., USA), and 10% platelet lysate (PL) or 10% FCS, at 37°C and 5% CO₂. At 80% confluence MSC were detached with trypsin enzyme digestion, counted and replated. MSC were plated at 3x10⁵ cells/cm² at P₀ and 5x10³ cells/cm² for following passages. PL was produced in house. Briefly, platelets passed through freezing and thawing cycle, centrifuged 4 times at 3000g for 30 min, sterilized through 0,22 µm filter, heparinized and stored in -20°C freezer for up to 3 months [9]

Detection of cell viability

Trypan blue viability assay was performed on cells before culture. Viability percentage was determined using a Neubauer haemocytometer chamber after staining the cells with 0.4% trypan blue. The accepted mean viability was over 90% (87-99%).

Statistical Analyze

For proliferation analyses were used one-way Anova and Tukey's Post Hoc; Paired T test was used when applicable.

Adipose derived Mesenchymal Stromal cells (AD-MSC)

AD-MSC isolation was modified from Zuk et al [13]. Briefly, 40-60 mL lipoaspirate was collected from plastic surgery procedure. Whole material was washed 3 times with PBS using a syringe in a 1:1 volume proportion. Wash lipoaspirated adipose tissue was then incubated with 0,2% type I collagenase solution in a 10:1 volume for 30 minutes in 37°C, vigorously agitating at each 10 minutes. Cells were centrifuged

at 800g for 10 min, pellet was incubated in NH₄CL erythrocyte lysing solution for 10 min, centrifuged at 400g 10 min, counted and cultured as stated above.

Bone Marrow Mesenchymal Stromal cell (BM-MSc)

BM-MSCs were isolated from normal donor bone marrow harvest for transplant or transplant-discarded filters. In brief, filters were washed with 200mL PBS (Gibco, Invitrogen Corp., USA), cells were centrifuged at 400g 10 min, counted and cultured as stated above[14]

Human Exfoliated Deciduous Teeth Mesenchymal Stromal cells (SHED-MSc)

Cells were extracted as previously described [15]. Briefly, completely healthy deciduous teeth were extracted and transported in PBS or culture medium. Cells were extracted from dental pulp with dentin curette. Dental pulp was placed in 0,2% type I collagenase and incubated at 37°C for 1h. Cells were centrifuged at 800g for 10 min, washed 2x with PBS and cultured in 12 well plates.

Mesenchymal Osteocyte, Adipocyte and Chondrocyte differentiation

Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation were performed in all cultures. Osteogenic differentiation was induced in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (DMEN Low) (Gibco, Invitrogen Corp., USA), FCS (Gibco, Invitrogen Corp., USA), ascorbic acid (0.2 mmol/L) (Acros Organics, Belgium), β -glycerophosphate (10mmol/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and dexamethasone (0.1 μ mol/L), (Hypofarma, Brasil) for 30 days. Adipogenic differentiation was induced in Iscove's Modified Dulbecco's IMDM (Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with 20% platelets poor human plasma, heparin (5.000UI/ml) (Eurofarma, Brasil), indomethacin (0.2mmol/L) (Merck Sharp & Dohme, USA) dexamethasone (0.1 μ mol/L), and insulin (10 μ mol/L) (Eli Lilly, Mexico). Chondrogenic differentiation was induced in DMEM Low supplemented with insulin (Cellofarm, Brazil), ascorbic acid and TGF- β (Invitrogen, USA). Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation were stained by Alizarin Red staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Oil Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and Alcian Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectively.

PBMC and T cell isolation

Venous blood was collected from healthy donors. Mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation in histopaque (Gibco, Invitrogen, USA). Cells were washed 2x in PBS, counted and cultured with RPMI low glucose (Gibco, Invitrogen, USA), 1% PENSTREP (Gibco, Invitrogen, USA) and 10% fetal bovine serum (FBS) or LP. For T cell isolation, PBMC were passed through magnetic column (MACS; Miltenyi Biotec) according to the manufacturer instructions; cells were counted and cultured with RPMI low glucose (Gibco, Invitrogen Corp., USA), 1% PENSTREP (Gibco, Invitrogen Corp., USA) and 10% fetal bovine serum (FBS) or LP.. T cells were obtained from PBMC by cultivation with fitohemagglutinin (PHA) at 10µg/mL for 3 days.

Comparison of proliferative potential of MSC

MSC from all sources were expanded until passage five for comparison of proliferative potential. Population doubling point formula was used to estimate the cell proliferation based on the time in culture, number of plated cells and the number of cells at moment of trypsinization at the chosen passage. A= n° trypsinized cells; B= n° plated cells; C= n° hours in culture.

$$\text{LOG}\left[\frac{A - B}{2}\right]/C$$

Coculture experiments

Protocol was adapted from Le Blanc et al. [16]. In brief, after 3 days of lymphocytes expansion, they were incubated with 5mM CFSE (Life Technologies Invitrogen), according to the manufacturer instructions. MSC were cultured until 2nd passage, trypsinized and washed. Lymphocytes and MSC were plated at 10:1 proportion for a concentration of 1x10⁶/mL lymphocytes. Cells were cultured for 3 days for proliferation and then supernatant containing lymphocytes were collected and analyzed by flow cytometry.

Flow Cytometry

Lymphocytes and MSC viable cells were counted and adjust for a concentration of 2 x 10⁶ cell/mL in PBS, the cells were distribute in flow cytometry tubes (50 µ L/tube), 5uL – to 10uL of the following antibodies CD90, CD73, CD105 CD3, CD14, CD 45,

CD34, CD19, HLDR MSC markers; CD3, CD4, CD8 lymphoid markers; CD4 CD25, FOXP3 Treg markers; CD3, CD56 NK markers; CD19 B cell marker. Cells were incubated for 30 min at 4°C, protected from light. Next, cells were centrifuged at 400 g for 10 min to remove the unbound antibodies and resuspended in 0.5 mL PBS. The cells were assayed in a flow cytometer (FACSCanto II, Becton Dickinson) and the data analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson). MSC were defined by the expression of CD105, CD73, CD90 and the absence of HLA-DR, CD19, CD14, CD34 and CD45.

Results

Samples description

There were a total of 10 samples analyzed, three from BM and SHED, and four from adipose tissue. Table 1 describes the general characteristics of the samples.

Table 1: MSC general characteristics.

Source	Age	Gender
SHED	6	M
SHED	6	M
SHED	8	M
BM	24	M
BM	28	F
BM	30	M
AD	33	F
AD	22	F
AD	34	F
AD	26	F

F: Female; M: male; BM: bone marrow; AD: adipose tissue; SHED: dental pulp from human exfoliated deciduous teeth.

Mesenchymal stromal cell Immunophenotype from three distinct sources

Mesenchymal cells were analyzed by flow cytometry as stated in Methods, and MSC from all were characterized in accordance to the ISCT [11].

Mesenchymal Adipocyte, chondrocyte and osteocyte differentiation

All sources of MSC were able to multilineage differentiation in adipocytes, chondrocytes and osteocytes, as shown in figure 1.

Proliferation of BM-, SHED-, and AP-MSC

Adipose derived MSC had a significantly ($p=0,0017$) better proliferation ratio, then the other sources in all passages. BM and SHED had no difference among them, as stated in figure 2.

MSC are capable to inhibit lymphocyte proliferation

To answer if all three sources had the same immunomodulation potential, it was analyzed the capability of MSC to inhibit lymphocyte proliferation through CFSE by flow citometry. All sources inhibited lymphocyte proliferation both in T and PBMC group, as showed in Figure 3.

Immunophenotyping of T and PBMC lymphocytes cocultured with MSC

To address if MSC could have different influence in lymphocytes subsets as a mechanism of action for their immunomodulation ability, the effect of MSC from each source on PBMC or isolated T cells subsets CD4, CD8, Treg, NK lymphocytes, and B cells were analyzed. MSC of all sources, except Adipocyte tissue, were able to tend to diminish all lymphocytes subsets in co-cultures experiments either with PBMC or T cells. SHED-MSCs were more efficient in significantly inhibiting PBMC derived Treg and TCD4⁺ cells ($p=0,01$ and $p=0,02$ respectively) then MSCs of any other source. On the other hand, AD-MSC had more profound and differential effects either when co-cultured with PBMC or isolated T cells. AD-MSC were able to statistically decreased ($p=0,04$) the number of B lymphocytes from PBMC, and when co-cultured with isolated T cells it significantly decreased CD8⁺ ($p=0,008$) and increased Treg ($p=0,01$) lymphocytes (Figure 4)

LP has different lymphocyte subset stimulation

To address if LP can increase any type of lymphocyte subset, we compared PBMC and T cells proliferation and immune phenotype cultured with SBF or LP. Either from PBMC or isolated T cells, PL alone significantly ($p=0,01$ and $p=0,02$, respectively)

increased Treg expression. Furthermore, differently from MSC, LP does not change proliferation among the groups (figure 5)

Discussion

Mesenchymal stromal cells are been tested in clinical trials for the treatment of several immune related diseases [17], as well as, in regenerative medicine [18]. MSC, along with other mesodermal derived cells, are present in several organs and tissues stroma and its regenerative and immunomodulation potential might vary with the different milieu it is obtained of. Here we show the results of co-culturing MSC from three different sources: adipocyte, bone marrow and SHED with unseparated PBMC and CD3⁺ isolated T cells. Additionally, different human derived supplements for cell cultures are been tested in order to avoid unwanted xenoreactions already described when fetal calf serum is utilized as supplement [19].

As showed by others [20], in our hands, AD-MSC exhibited a significant superior proliferative (Figure 2) and immunomodulation effect (Figure 3). BM and SHED derived MSC tend to decrease T cells subsets (CD4, CD8, Treg, NK lymphocytes) either from unseparated PBMC or isolated T cells. SHED-MSCs, however, were able to significantly decrease CD 4⁺ and Tregs ($p= 0,02$ and $p= 0,01$, respectively), the CD4⁺ decrease subset could, however, be secondary to the decrease observed in Tregs, since both belong to the CD4 subset.

AD-MSCs not only exhibited a higher proliferative capacity but also were able to significantly ($p=0,04$) decrease B cells from PBMC. When co-cultured with purified T cells AD-MSC significantly decrease CD8⁺ ($p=0,008$) cells and increase Tregs ($p=0,01$). Additionally, to test a possible influence of the type of supplement utilized in MSC cultures, we showed that platelet lysate also have an independent immunomodulation effect: it significantly increases Tregs when utilized as a supplement for PBMC or T lymphocytes $p= 0,01$ and $p= 0,02$, respectively (Figure 5). However, the observed increase in Tregs in co-cultures with T lymphocytes cannot be attributed to the use of PL alone, since all cultures, from all sources were tested in

the presence of PL and only the AD-MSCTcell co-culture effectively increased Tregs.

T regulatory cells are known to modulate graft versus host disease (GVHD)[21] and autoimmunity [22]. AD-MSCT might turn out to be the ideal type of MSC to be tested in cellular therapy trials for these diseases. In this study, coculture of AD-MSCT and magnetically purified T cells, significantly increased Treg cells. In accordance with literature [10] this effect could be a mechanism for immunosuppression.

As stated above, SHED when cultured with PBMC were significantly effective in decreasing T CD4⁺ cells and Tregs, an effect that could be attributed to the fact that in cases of aggression and lymphocyte infiltration, pulp MSC allows T CD8⁺ infiltration and expansion in a dose dependent manner in the presence of bacterial or fungal infections, decreasing CD4⁺ numbers [23] [24]. SHED-MSCT could be utilized in such clinical settings.

In accordance with Lee et al [25], we demonstrated that LP alone can increase Treg phenotype. A study on the effects of MSC of different sources cultured either with FCS or PL is underway to see if the observed PL related Tregs increase can affect MSC from different tissues. Finally, TGF- β known to be present in PL can strongly induce Treg phenotype and MSC homing in GVHD [26] [27]. PL effect on Tregs might be attributed to this growth factor [28] [29]

Conclusions

Adipocyte derived MSC, among other tissue derived MSC, can proliferate better and among other MSC sources be more efficient in inducing immunoregulatory cells. BM derived MSC is an approved cellular therapy for steroid resistant GVHD, and are being tested for a variety of inflammatory diseases. BM derived cells are suited for cellular therapy because they are obtained from a healthy hematopoietic stem cell transplant donor tested for all known microbial infections. Lipoaspirate, on the other hand, is usually obtained from plastic surgery, where possible infective pathogens are not taken into consideration. Autologous lipoaspirate in the setting of an inflammatory disease is a rather invasive procedure. In spite of that, adipocyte derived MSC cultured with PL, might be the best type of MSC for the treatment of inflammatory or autoimmune disease.

Acknowledgment

The study received financial support from Hospital de Clinicas de Porto Alegre investment Research fund (FIPE-HCPA), Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, CAPES and FINEP (escrever em portugues os nomes destas siglas por extenso – o laboratório e o material que utilizaste foram montados por estas agencias)

Conflict of Interest:

The authors declare no conflict of interests.

References

- [1] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, and U. V Gerasimov, "Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplanted in diffusion chambers.," *Cell Tissue Kinet.*, vol. 20, no. 3, pp. 263–272, 1987.
- [2] A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina, "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.," *Exp. Hematol.*, vol. 4, no. 5, pp. 267–274, 1976.
- [3] Y. Wang, X. Chen, W. Cao, and Y. Shi, "Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications," *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 11, pp. 1009–1016, 2014.
- [4] P. Laranjeira, M. Pedrosa, S. Pedreiro, J. Gomes, A. Martinho, B. Antunes, T. Ribeiro, F. Santos, H. Trindade, and A. Paiva, "Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive , memory and effector T cells," vol. 6, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [5] B. Yu, X. Zhang, and X. Li, "Exosomes derived from mesenchymal stem cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 4142–4157, 2014.
- [6] A. G. Via, A. Frizziero, and F. Oliva, "Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources.," *Muscles. Ligaments Tendons J.*, vol. 2, no. 3, pp. 154–62, 2012.
- [7] B. R. Sousa, R. C. Parreira, E. a Fonseca, M. J. Amaya, F. M. P. Tonelli, S. M. S. N. Lacerda, P. Lalwani, A. K. Santos, K. N. Gomes, H. Ulrich, A. H. Kihara, and R. R. Resende, "Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications.," *Cytometry. A*, vol. 85, no. 1, pp. 43–77, Jan. 2014.
- [8] H. Jin, Y. Bae, M. Kim, S.-J. Kwon, H. Jeon, S. Choi, S. Kim, Y. Yang, W. Oh, and J. Chang, "Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 17986–18001, 2013.
- [9] L. Silla, V. Valim, B. Amorin, A. P. Alegretti, F. Dos Santos de Oliveira, M. A. Lima da Silva, A. Dahmer, N. Emerim Lemos, M. A. Mentz Albrecht, Á. Macedo Laureano, C. Bonfim, L. Moraes

- Júnior, A. Pezzi, L. Baggio, C. A. M. Albrecht, M. Capra, L. Fogliatto, L. Della Costa Rigoni, G. Fischer, A. Paz, and L. Esteves Daudt, "A safety and feasibility study with platelet lysate expanded bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of acute graft-versus-host disease in Brazil.," *Leuk. Lymphoma*, vol. 55, no. 5, pp. 1203–5, May 2014.
- [10] P. Iudicone, D. Fioravanti, G. Bonanno, M. Miceli, C. Lavorino, P. Totta, L. Frati, M. Nuti, and L. Pierelli, "Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells.," *J. Transl. Med.*, vol. 12, no. 1, p. 28, 2014.
- [11] E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, and A. Keating, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 5, pp. 393–395, 2005.
- [12] R. Haddad and F. Saldanha-Araujo, "Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: What do we know so far?," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [13] P. a Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, a J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick, "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 211–28, Apr. 2001.
- [14] C. Capelli, M. Domenghini, G. Borleri, P. Bellavita, R. Poma, a Carobbio, C. Micò, a Rambaldi, J. Golay, and M. Introna, "Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts.," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 40, no. 8, pp. 785–791, 2007.
- [15] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey, and S. Shi, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 25, pp. 13625–30, Dec. 2000.
- [16] I. Rasmusson, O. Ringdén, B. Sundberg, and K. Le Blanc, "Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms," *Exp. Cell Res.*, vol. 305, no. 1, pp. 33–41, 2005.
- [17] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Götherström, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringdén, "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells.," *Lancet*, vol. 363, no. 9419, pp. 1439–41, May 2004.
- [18] A. I. Caplan and D. Correa, "The MSC: An injury drugstore," *Cell Stem Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 11–15, 2011.
- [19] H. Hameda, B. Giebel, and W. Wagner, "Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells," *Cytotherapy*, vol. 16, no. 2, pp. 170–180, 2014.
- [20] A. Mohammadzadeh, A. A. Pourfathollah, S. Shahrokhi, S. M. Hashemi, S. L. A. Moradi, and M. Soleimani, "Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 20, no. 2, pp. 316–21, Jun. 2014.

- [21] G. Socié and B. R. Blazar, "Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside.," *Blood*, vol. 114, no. 20, pp. 4327–36, Nov. 2009.
- [22] K. Wing and S. Sakaguchi, "Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 7–13, 2010.
- [23] L. Durutürk, S. Sarı, and A. Sengül, "Immunocompetent cell level as a diagnostic reference for pulpal pathosis of primary teeth.," *Arch. Oral Biol.*, vol. 58, no. 10, pp. 1517–22, Oct. 2013.
- [24] C. L. Hahn, A. M. Best, and J. G. Tew, "Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 12, pp. 6785–6789, 2000.
- [25] Y.-L. Lee, L.-W. Lee, C.-Y. Su, G. Hsiao, Y.-Y. Yang, S.-J. Leu, Y.-H. Shieh, and T. Burnouf, "Virally inactivated human platelet concentrate lysate induces regulatory T cells and immunosuppressive effect in a murine asthma model.," *Transfusion*, vol. 53, no. 9, pp. 1918–28, Sep. 2013.
- [26] S. Paczesny, N. Raiker, S. Brooks, and C. Mumaw, "Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine.," *Int. J. Hematol.*, vol. 98, no. 3, pp. 275–92, Sep. 2013.
- [27] J. E. L. Visentainer, S. R. Lieber, L. B. L. Persoli, A. C. Vigorito, F. J. P. Aranha, K. A. de Brito Eid, G. B. Oliveira, E. C. M. Miranda, and C. A. de Souza, "Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation.," *Exp. Hematol.*, vol. 31, no. 11, pp. 1044–50, Nov. 2003.
- [28] N. Fekete, M. Gadelorge, D. Fürst, C. Maurer, J. Dausend, S. Fleury-Cappellesso, V. Mailänder, R. Lotfi, A. Ignatius, L. Sensebé, P. Bourin, H. Schrezenmeier, and M. T. Rojewski, "Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active comp.," *Cytotherapy*, vol. 14, no. 5, pp. 540–54, May 2012.
- [29] D. A. Horwitz, S. G. Zheng, J. Wang, and J. D. Gray, "Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 4, pp. 912–5, Apr. 2008.

Figures:

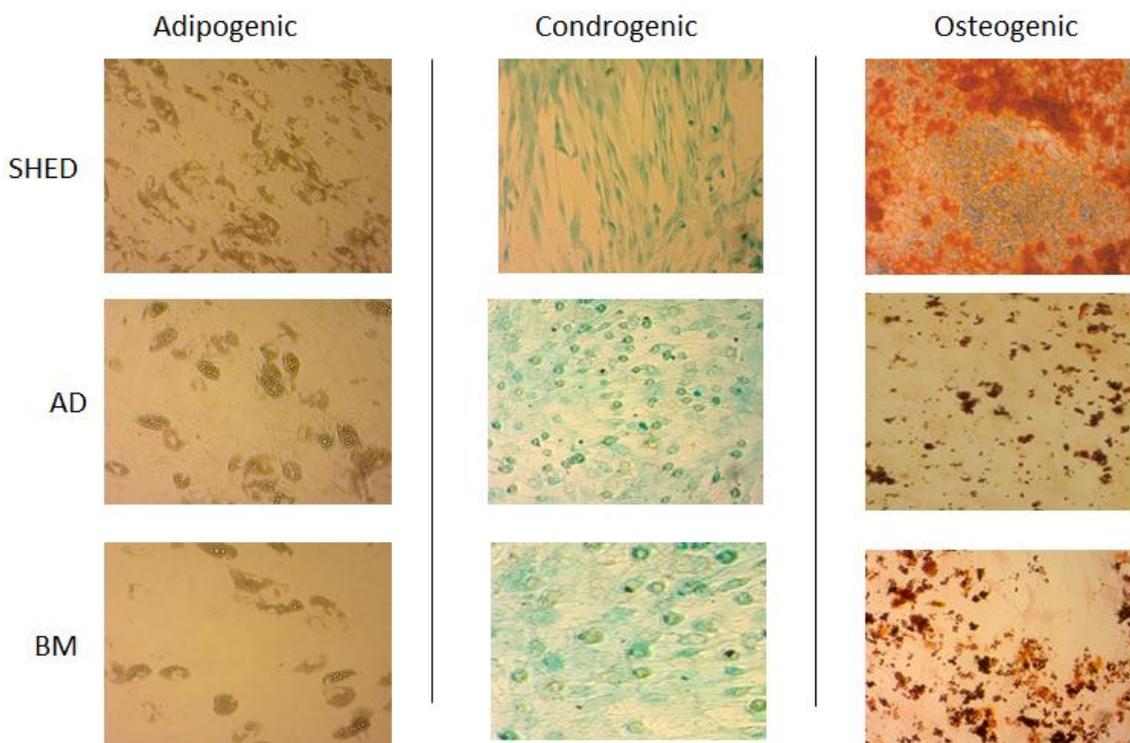


Figure 1: Multilineage differentiation of BM-, SHED- and AP-MSC.

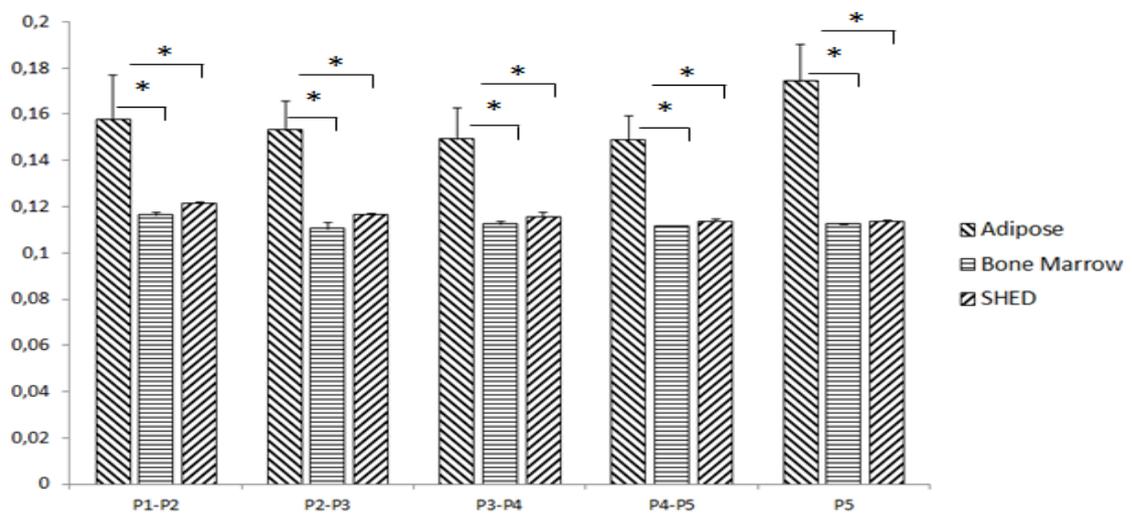


Figure 2: proliferation comparison of Bone Marrow, Human Exfoliated Deciduous Teeth and Adipose Tissue MSC .

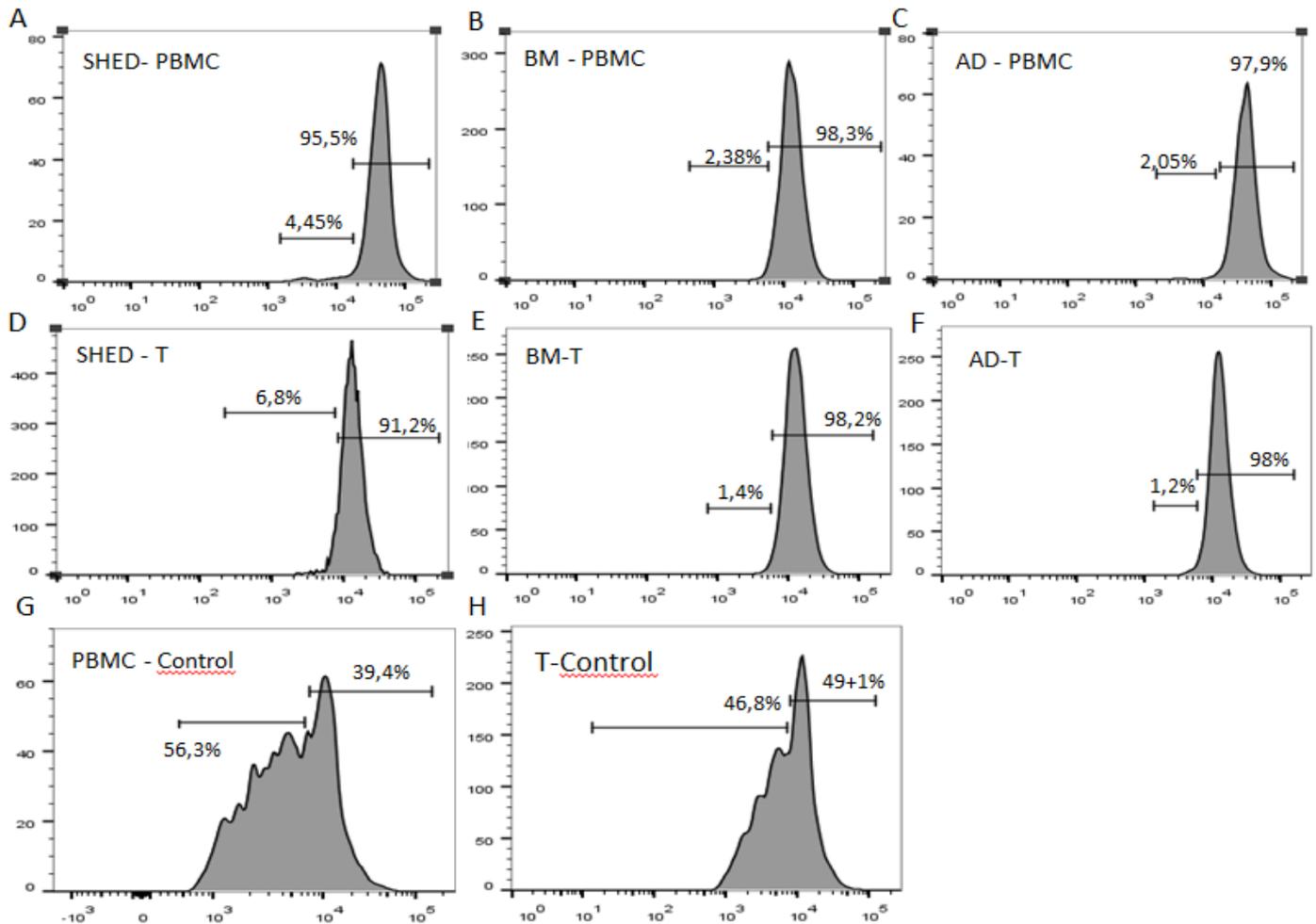


Figure 3: Effect of adipocyte derived MSC (AD-MSC), Human Exfoliated Deciduous Teeth derived MSC (SHED-MSC) and bone marrow derived MSC (BM-MSC) immunomodulation cocultured for 3 days with CFSE labeled isolated T cell and PBMC at 10:1 lymphocyte MSC ratio and controls. **A:** SHED MSC cocultured with PBMC. **B:** BM MSC cocultured with PBMC. **C:** AD MSC cocultured with PBMC. **D:** SHED MSC cocultured with magnetically isolated T cells. **E:** BM MSC cocultured with magnetically isolated T cells. **F:** AD MSC cocultured with magnetically isolated T cells. **G:** PBMC control cultured in absence of MSC. **H:** magnetically isolated T cells control cultured in absence of MSC.

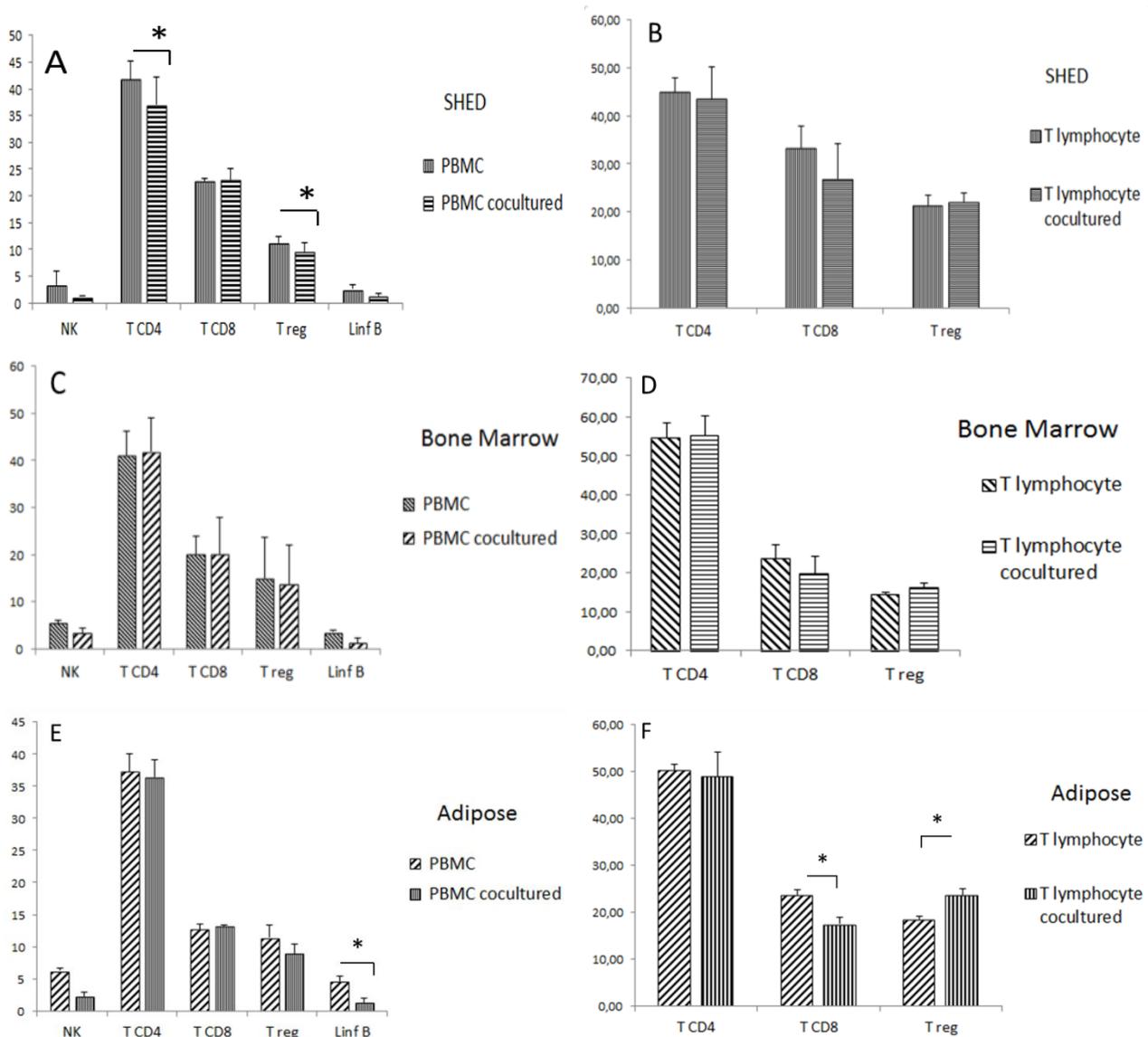


Figure 4: Effect of adipocyte derived MSC (AD-MSC), Human Exfoliated Deciduous Teeth derived MSC (SHED-MSC) and bone marrow derived MSC (BM-MSC). **A:** SHED-MSC co-cultured with PBMC compared to control, statistically decreased Treg ($p=0,01$) and $CD4^+$ ($p=0,02$) lymphocytes. **B:** SHED-MSC co-cultured with isolated T cells compared to control did not have a significant influence on T cell subsets. **C:** BM-MSC co-cultured with PBMC compared to control did not significantly influence T lymphocytes subsets neither from PBMC nor isolated T cells. **D:** BM-MSC co-cultured with isolated T cells compared to control also did not have influence in T lymphocytes subsets. **E:** AD-MSC co-cultured with PBMC compared to control, statistically decreased B lymphocyte ($p=0,04$) **F:** AD-MSC co-cultured with isolated T cells compared to control, statistically decreased $CD8^+$ ($p=0,008$) and increased Treg ($p=0,01$) lymphocytes.

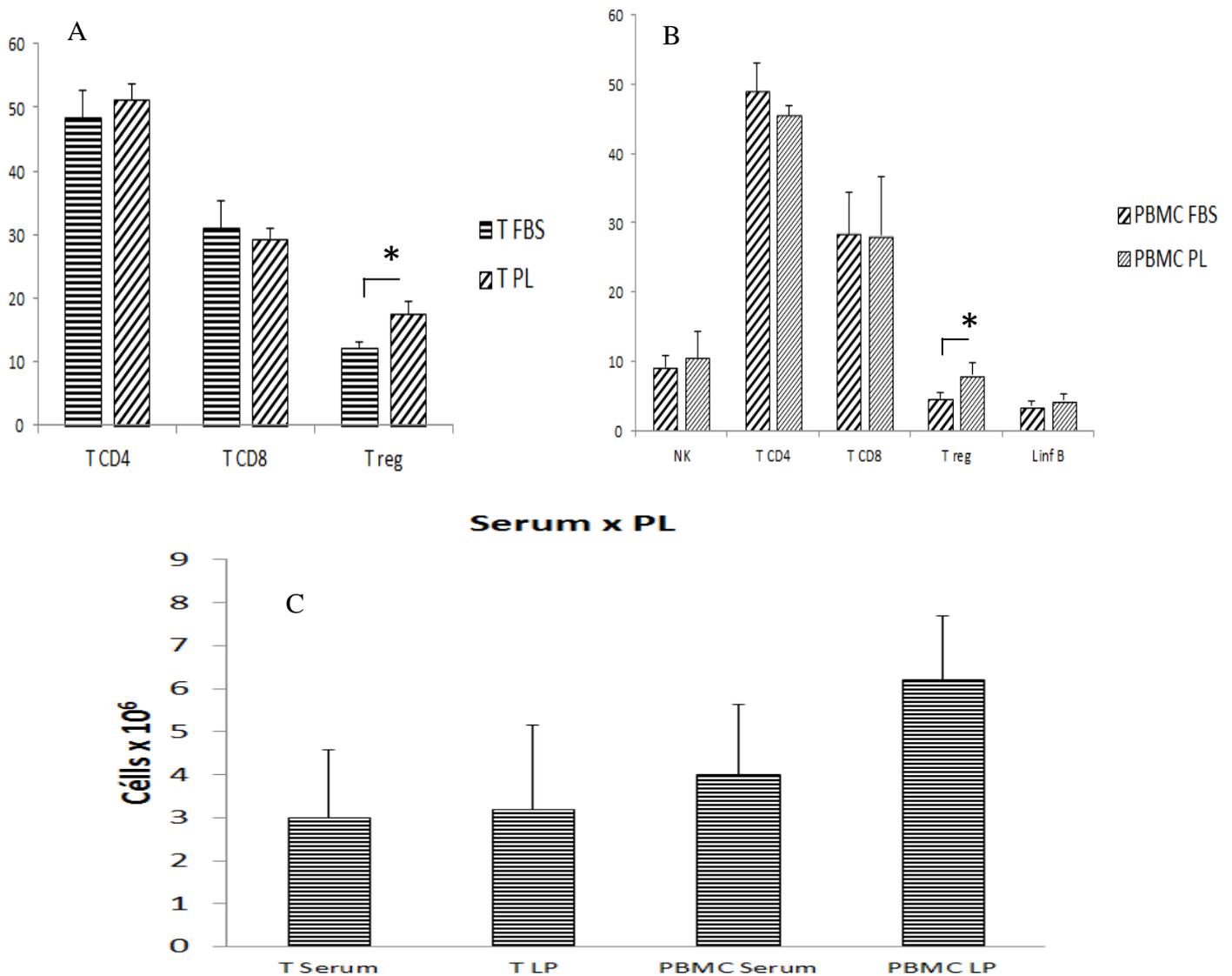


Figure 5: Comparison of platelet lysate (LP) and fetal bovine serum (FBS) effect on proliferation and lymphocytes subsets. **A:** isolated T cells cultured with LP and FBS, LP significantly ($p=0,02$) induce T reg phenotype. **B:** PBMC cultured with LP and FBS, LP significantly ($p=0,01$) induce T reg phenotype. **C:** proliferative potential of PBMC or isolated T cells with PL or FCS did not differ when cultured with PL or FCS.

7. Considerações Finais

Em nosso laboratório realizamos pesquisa de terapia celular tanto com células tronco mesenquimais visando estudos clínicos para tratamento de doenças auto imunes, como doença do enxerto contra o hospedeiro, como outras células do sistema imune, como células NK. Determinar o impacto de diferentes possíveis fontes, teve o objetivo de otimizar a produção de células, analisada pela proliferação celular neste trabalho, assim como a eficiência, analisada pela inibição da proliferação de linfócitos e a imunofenotipagem de seus subtipos.

8. Perspectivas Futuras

Outros estudos em andamento no laboratório complementarão estes dados, envolvendo principalmente o perfil de citocinas após a injeção de CTM. Além disso, outros parâmetros estão sendo implementados, como análise de microvesículas e exossomos.