

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-graduação em Patologia Molecular

**Efeito do peptídeo catelicidina LL-37 sobre a propriedade
imunossupressora das células-tronco mesenquimais**

Martha de Oliveira Bravo

Brasília, DF
2016

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-graduação em Patologia Molecular

**Efeito do peptídeo catelicidina LL-37 sobre a propriedade
imunossupressora das células-tronco mesenquimais**

Martha de Oliveira Bravo
Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo
Coorientador: Rinaldo Wellerson Pereira

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Patologia Molecular.

Brasília, DF
2016

Ficha catalográfica

Bravo, Martha de Oliveira

Efeito do peptídeo catelicidina LL-37 sobre a propriedade imunossupressora das células-tronco mesenquimais

Martha de Oliveira Bravo - Brasília, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Dissertação de mestrado (Patologia Molecular), Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília – UnB

1.Células-tronco mesenquimais, catelicidina LL-37, função imunorregulatória

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), sob orientação do Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Banca Examinadora

Presidente:

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular
Universidade de Brasília

Titulares:

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Robert Edward Pogue
Departamento de Ciências Genômicas e Biotecnologia
Universidade Católica de Brasília

Suplente:

Prof. Dr. José Raimundo Correa
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, pelo milagre da vida e pela oportunidade que me foi dada de melhorar a cada dia.

Meu agradecimento especial à minha família: à minha mãe – pelo amor incondicional, por todo seu carinho, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo incentivo nos momentos de desânimo, por aguentar meu estresse nos dias de correria e, finalmente, por ser essa pessoa tão maravilhosa. Ao meu pai (*in memoriam*), por todo sacrifício feito para que seus filhos tivessem o melhor, por todas as sábias palavras de apoio e aprendizagem, por todo amor, carinho, exemplo e ajuda para trilhar os caminhos. Você faz muita falta. Às minhas irmãs e ao meu irmão, só tenho a agradecer pelas pessoas maravilhosas que são e pelo amor único e sincero entre irmãos, pela cumplicidade, sinceridade e estarem presentes sempre que preciso. Família, amo muito cada um de vocês, vocês são minha vida e minha inspiração.

Ao meu namorado, Daniel, meu muito obrigada pela paciência e por ter segurado minha mão e caminhado junto para enfrentar os momentos difíceis, por estar presente nos momentos mais felizes da minha vida e por ser esse companheiro maravilhoso, te amo. Também não posso deixar de agradecer aos meus sogros por serem tão maravilhosos comigo e a quem considero meus segundos pais e mães.

Agradeço à minha cadela Vitória, por ser minha companheira em todos os momentos e por me recepcionar tão calorosamente quando chego em casa. Vivi, sem você meu quarto seria vazio.

Aos meus amigos e amigas, obrigada pelas conversas, pelos desabafos, pela compreensão nos meus momentos de ausência, por compartilhar choros e risadas, enfim, por serem um pedacinho de mim que não vivo sem. Juju e Mari, um agradecimento aos nossos 27 anos de amizade; Gabi, obrigada pelo exemplo de amiga que você é e também por ser minha companheira de cinema; Ju, obrigada por ser tão fofa mesmo de tão longe. Amigos da Vet, que a nossa amizade dure para sempre! Enfim... são tantas pessoas especiais que não cabe aqui. Amo vocês.

Agradeço ao laboratório de Farmacologia Molecular, em especial ao Prof. Francisco e aos outros professores, pelo espaço cedido e pela paciência; Aos amigos que lá fiz, obrigada por toda a ajuda e compreensão.

Ao laboratório de Patologia Molecular do Câncer, obrigada pelo acolhimento e também por toda a ajuda que recebi.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci de Ribeirão Preto-USP, por ter cedido às células tronco para realização desta pesquisa e pela USP de Ribeirão Preto pela parceria.

Obrigado ao pessoal do Labiogene – IB, por ter concedido o uso do Citômetro de Fluxo.

Também agradeço a parceria da Universidade Católica de Brasília, ao meu coorientador Prof. Rinaldo Pereira, ao Prof. Octavio Franco e à Profa. Juliana Lott Carvalho.

Agradeço ao CNPQ pela bolsa concedida e à FAPDF por fomentar a execução desse projeto (processos 193.000.665/2015 e 193.000.921/2015).

Agradeço finalmente ao meu mestre, Prof. Felipe Saldanha de Araújo, por todos os seus ensinamentos, pela paciência e compreensão. Por sanar todas as minhas dúvidas e estar presente em cada passo desta pesquisa; pela sua disponibilidade em responder e-mails, mensagens e ligações e pelo empenho e esforço para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Células-Tronco Mesenquimais	16
1.2 Catelicidina LL-37	21
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Isolamento e cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)	27
3.2 Caracterização imunofenotípica e diferenciação das CTMs	28
3.3 Ensaio de viabilidade/proliferação das CTMs por MTT	28
3.4 Ensaio de migração das CTMs pela técnica de “ <i>wound scratch assay</i> ”	29
3.5 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)	30
3.6 Ensaio de imunossupressão de CMSP por CTMs	31
3.7 Efeito de LL-37 sobre o potencial supressor de CTMs	32
3.8 Ensaio de proliferação de linfócitos T em presença de LL-37	33
3.9 Licenciamento das CTMs por LL-37	33
3.10 Expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs por Citometria de Fluxo	34
3.11 PCR em tempo real	34
4 RESULTADOS	
4.1 Fenotipagem e diferenciação das CTMs	37
4.2 LL-37 não induz a proliferação de CTMs	38
4.3 LL-37 acentua o potencial migratório de CTMs	39
4.4 CTMs inibem a proliferação de CMSP	41
4.5 LL-37 acentua a proliferação de linfócitos T ativados	42
4.6 LL-37 realça o potencial supressivo das CTMs sobre linfócitos T	43
4.7 LL-37 não licencia as CTMs	44

4.8	LL-37 modula a expressão de RTT3 em CTMs	44
4.9	Modulação gênica por LL-37	45
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) desempenham importante função imunorregulatória, por escapar do reconhecimento imune e suprimir a resposta imunológica. A infusão de CTMs é útil para o tratamento de situações em que o sistema imunológico apresenta resposta exacerbada, como na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Entretanto, o elevado número de células necessário para a obtenção do efeito terapêutico desejado constitui um grande limitante para o uso clínico dessas células. Para realçar o potencial supressivo das CTMs, duas estratégias têm sido realizadas: o condicionamento (licenciamento) e a terapia combinada de CTMs com imunossuppressores. A catelicidina (LL-37) é um peptídeo antimicrobiano que exerce diversas funções modulatórias sobre a resposta imune, estimulando, em alguns contextos a produção de fatores anti-inflamatórios, como IL-10 e, em outros, estimulando mediadores pró-inflamatórios. Com base nesse contexto, avaliamos, *in vitro*, se o condicionamento de CTMs pelo peptídeo LL-37 realça o potencial supressivo dessas células e se esse peptídeo poderia ser utilizado como adjuvante das CTMs na supressão de linfócitos T. Além disso, investigamos se esse peptídeo exerce efeito sobre a proliferação e potencial migratório das dessas células. Por fim, investigamos a influência de LL-37 na expressão do receptor tipo toll-3 (RTT3) e no perfil de expressão gênica das CTMs. O condicionamento das CTMs com peptídeo LL-37 não influenciou o potencial supressivo dessas células, entretanto, quando usado como adjuvante, LL-37 aumenta o efeito supressor das CTMs. A catelicidina LL-37 não influenciou a capacidade proliferativa das CTMs, mas quando usada como adjuvante realçou o potencial migratório dessas células. Por fim, investigamos mecanismos moleculares que poderiam sustentar os efeitos funcionais observados. LL-37 induziu aumento da expressão do RTT3 nas CTMs e a hiperexpressão de genes anti-inflamatórios, o que, em parte, pode explicar os efeitos observados. De modo geral, os resultados obtidos nesse estudo, podem servir de base para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras que tenham por objetivo realçar propriedades fundamentais das CTMs, como o efeito imunossupressivo e o potencial migratório, garantindo, ao mesmo tempo, efeito contra microrganismos oportunistas.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) play an important immunoregulatory function, to escape immune recognition and suppress the immune response. Infusion of MSCs is useful for treatment of conditions where the immune system has exacerbated response, as in graft-versus-host disease (GVHD). However, the large number of cells needed to achieve the desired therapeutic effect is a major limitation to the clinical use of these cells. To enhance the suppressive potential of MSCs, two strategies have been carried out: the conditioning (licensing) and combination MSCs therapy with immunosuppressants. The cathelicidin (LL-37) is an antimicrobial peptide that exerts various modulatory functions on the immune response, stimulating, in some contexts the production of anti-inflammatory factors, such as IL-10, and others, stimulating proinflammatory mediators. Within this context, evaluated in vitro as MSCs conditioning the LL-37 peptide enhances the suppressive potential of these cells and this peptide could be used as adjuvant of MSCs in suppression of T lymphocytes. Furthermore, we investigated whether this peptide has an effect on the proliferation and migration potential of these cells. Finally, we investigated the influence of LL-37 in the toll-like receptor type 3 expression (TLR3) and gene expression profile of MSCs. The conditioning of MSCs with LL-37 peptide did not affect the suppressive potential of these cells, however, when used as adjuvant, LL-37 increases the suppressive effect of MSCs. The LL-37 cathelicidin did not affect the proliferative capacity of MSCs, but when used as an adjuvant enhanced the migration potential of these cells. Finally, we investigate molecular mechanisms that could sustain the observed functional effects. LL-37 induced increased expression in MSCs TLR3 and overexpression of anti-inflammatory genes, which in part may explain the observed effects. In general, the results obtained in this study could serve as the basis for the development of innovative therapeutic approaches which aim to enhance the fundamental properties of MSCs as immunosuppressive effect and migration potential, ensuring at the same time, effect against opportunistic microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenotipagem das CTMs por Citometria de Fluxo.....	37
Figura 2. Diferenciação funcional de CTMs.....	38
Figura 3. Análise de Viabilidade/Proliferação Celular.....	38
Figura 4. Migração das CTMs.....	40
Figura 5. Ensaio de Proliferação de linfócitos.....	42
Figura 6. Proliferação de linfócitos cultivados com CTMs.....	43
Figura 7. Proliferação de Linfócitos T.....	43
Figura 8. Proliferação de linfócitos cultivados com CTMs licenciadas.....	44
Figura 9. Expressão de RTT em CTMs.....	45
Figura 10. Expressão gênica das CTMs.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTMs = Células-tronco Mesenquimais

DECH = Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

CMSP = Células Mononucleares do Sangue Periférico

µg = micrograma

µL = microlitro

µM = micromolar

cDNA = do inglês "*Complementary Desoxiribonucleic Acid*"

DMSO = Dimetilsulfóxido

FITC = do inglês "*Fluorescein isothiocyanate*"

HGF = do inglês "Hepatocyte Growth Factor"

HLA = do inglês "*Human Leukocyte Antigen*"

IDO = Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN-γ = Interferon gamma

IL = do inglês "*Interleukin*"

MHC = do inglês "Major Histocompatibility Complex"

NK = do inglês "*Natural Killer*"

NO = do inglês "Nitric Oxid"

PBS = do inglês "*Phosphate Buffered Saline*"

PCR = do inglês "*Polymerase Chain Reaction*"

PGE₂ = do inglês "*Prostaglandin 2*"

RNA = do inglês "*Ribonucleic Acid*"

RTT = Receptor do tipo Toll

rpm = rotações por minuto

SBF = Soro Bovino Fetal

TGF- β : Do inglês "*Transforming Growth Factor beta*"

TNF = do inglês "*Tumor Necrosis Factor*"

I-INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Células-Tronco Mesenquimais

As células-tronco correspondem a uma população celular que possui capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens e apresenta potencial de auto-renovação (WILLIAMS; HARE, 2011). Essas células são classificadas em totipotentes, presentes nos zigotos e originam todos os tecidos embrionários; pluripotentes, presentes nos embriões e se diferenciam em todas as células do organismo humano e; em multipotentes, presentes em organismos adultos e possuem capacidade limitada de gerar células diferenciadas (SOUZA et al., 2003).

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), primariamente identificadas no fim da década de 60 por Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN et al., 1970), são capazes de se diferenciar em culturas *in vitro*, em osteócitos, condrócitos e adipócitos (BROOKE et al., 2007; PERONI et al., 2008). Essas células com morfologia fibroblastóide foram inicialmente isoladas da medula óssea, entretanto, sabe-se que as CTMs podem ser obtidas de praticamente todos os tecidos, tanto em humanos, quanto em camundongos (PANEPUCCI et al., 2004; MEIRELLES, L. DA S. et al., 2006).

A falta de um marcador específico para identificação das CTMs, fez com que a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabelecesse três critérios básicos para a identificação dessas células: elas devem se aderir ao plástico, apresentar perfil imunofenotípico específico e se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos. A caracterização fenotípica deve mostrar ausência de marcadores hematopoiéticos (CD31, CD14, CD34 e CD45) e moléculas co-

estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e presença dos marcadores CD29, CD73 e CD90 (DOMINICI et al., 2006).

Estudos sugerem que as características biológicas das CTMs de tecidos diferentes possam apresentar variações significativas, tanto no que diz respeito à morfologia, como à capacidade de diferenciação e perfil de expressão gênica (WILLIAMS; HARE, 2011). Diversos pesquisadores têm investigado as diversas fontes celulares quanto às suas possíveis aplicabilidades, como na engenharia de tecidos, em transplantes de medula óssea, nas doenças autoimunes e até mesmo na terapia gênica (DEANS; MOSELEY, 2000).

Devido ao fato das CTMs estarem presentes em diversos tecidos do organismo, diferentes funções biológicas dessas células estão sendo investigadas. Algumas das funções descritas são: suportar a hematopoese, atuar na reparação tecidual e manter o nicho celular. Ademais, essas células possuem propriedades anti-apoptóticas, atuam na angiogênese e na regulação da resposta imune (MEIRELLES, L. et al., 2006). Outra importante propriedade das CTMs que auxilia no exercício de suas funções é o potencial migratório dessas células. Já foi demonstrado que as CTMs migram para os locais de inflamação para exercer suas funções de reparação ou imunorregulação (TOMCHUCK et al., 2008).

Por apresentar baixa expressão de moléculas MHC, as CTMs são pouco imunogênicas, escapam do reconhecimento imune por células alo-reativas e inibem a resposta imunológica (BARTHOLOMEW et al., 2002; BLANC; RINGDE, 2003; MAITRA et al., 2004). As CTMs expressam moléculas HLA classe I, porém não apresentam expressão de moléculas HLA classe II, contudo, essa expressão pode ser induzida através da exposição dessas

células ao INF- γ (CASSATELLA et al., 2011). Todavia, mesmo em elevadas concentrações de INF- γ , as CTMs não mostram potencial imunogênico e são ainda capazes de escapar do reconhecimento imunológico, o que indica que esses mecanismos não dependem da expressão das moléculas HLA de classe I e II (KRAMPERA et al., 2003; POTIAN et al., 2003; RASMUSSEN, 2006).

O fato das CTMs possuírem capacidade de regular o sistema imune atraiu a atenção de diversos pesquisadores, especialmente devido ao potencial uso terapêutico dessas células para tratamento de doenças autoimunes ou de outras desordens que possuem exacerbação do sistema imunológico, como ocorre, por exemplo, na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Nesta doença, os linfócitos T do doador da medula óssea transplantada reconhecem as diferenças de HLA das células do receptor, gerando uma inflamação generalizada e sérias lesões em pele, intestino e outros órgãos, o que frequentemente leva o paciente à morte (ANTIN, 2001). Devido às suas propriedades imunorregulatórias, as CTMs deram origem ao primeiro medicamento à base de células, chamado PROCHYMAL (Osiris Therapeutics - www.osiris.com), sendo utilizadas clinicamente para tratar pacientes que possuem DECH e não respondem ao tratamento convencional feito com o uso de corticoides (BONIN, VON et al., 2009).

A ação imunossupressiva dessas células frente aos linfócitos T, ocorre, *in vitro*, basicamente por três principais mecanismos: adesão célula-célula (CTM – linfócito), liberação de fatores solúveis e indução de linfócitos regulatórios (AULETTA et al., 2012; HADDAD R., SALDANHA-ARAUJO F., 2014). Estudos demonstraram, com o uso de membranas semipermeáveis

(Trans-well), que apenas a troca de fatores solúveis é suficiente para que ocorra supressão da resposta imune, uma vez que nesses modelos não há o contato célula-célula (KLYUSHNENKOVA et al. 2005; NICOLA, DI et al., 2002; TSE et al., 2003). Porém, este efeito não se dá na mesma intensidade de quando se permite o contato entre as CTMs e os linfócitos (KLYUSHNENKOVA et al. 2005; NICOLA, DI et al., 2002; TSE et al., 2003). Alguns fatores participativos dos mecanismos pelos quais as CTMs imunomodulam os linfócitos já foram descritos, como HGF (NICOLA, DI et al., 2002), TGF- β (NICOLA, DI et al., 2002),IDO (MEISEL et al., 2004), PGE2 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005), Adenosina (SALDANHA-ARAUJO F., 2011) e NO (SATO et al., 2006).

Além da importância do contato célula-célula e da liberação de fatores solúveis, as CTMs são capazes de induzir a diferenciação de células regulatórias CD4+CD25^{hi}FOXP3+ (NICOLA, DI et al., 2002; MACCARIO et al., 2005), bem como de outras populações de linfócitos com capacidade supressora e fenótipo diferente dos linfócitos regulatórios clássicos (PREVOSTO et al., 2007; SALDANHA-ARAUJO et al., 2012).

Devido às propriedades imunomodulatórias das CTMs e ao melhor entendimento dos mecanismos de ação dessas células, diversas pesquisas clínicas foram realizadas, especialmente, com vistas ao tratamento da DECH (RINGDÉN et al., 2006; BLANC, LE et al., 2008). De modo geral, os estudos conduzidos permitiram concluir que as CTMs atuam de maneira eficaz na prevenção e tratamento da DECH. Contudo, os resultados obtidos são heterogêneos e nem todos os pacientes respondem à essa medida terapêutica. Uma meta-análise a partir dos dados encontrados na literatura, evidenciou que

crianças com DECH tendem a responder melhor ao tratamento com CTMs que indivíduos adultos (reposta completa 57,4% vs 45,1%) e que existe um número considerável de pacientes que não apresentam melhora com essa medida terapêutica (18% crianças vs 30,3% adultos) (WERNICKE et al., 2011) .

Para que as CTMs exerçam suas propriedades imunorregulatórias, essas células precisam ser ativadas, ou seja, necessitam de um estímulo que as sinalize de que tal função é necessária no ambiente em que se encontram. A ativação das CTMs, também chamada de licenciamento, parece ocorrer pela presença de citocinas inflamatórias que são capazes de aumentar a capacidade supressora dessas células (RYAN et al., 2007; ENGLISH et al., 2007).

Em um modelo murinho de DECH foi demonstrado aumento do potencial supressivo das CTMs, quando essas células foram previamente tratadas com INF- γ . Neste estudo, a infusão de CTMs licenciadas por INF- γ levou a resultados mais homogêneos e manteve a sobrevivência de todos os camundongos transplantados, quando comparado ao tratamento com infusão de CTMs não ativadas. Além disso, essa estratégia permitiu o uso de menor número de CMTs para se alcançar o benefício terapêutico desejado (POLCHERT et al., 2008). Nesse ponto, o grande problema é que esses efeitos parecem não ocorrer com CTMs humanas (CHINNADURAI et al., 2014).

Até o momento, os trabalhos que foram voltados ao licenciamento de CTMs humanas, mostraram resultados mais promissores ao se manipular a sinalização de receptores tipo toll (RTT) das CTMs (CHRISTIANE A. OPITZ et al., 2009; WATERMAN et al., 2010). As CTMs expressam RTT funcionais que, quando ativados induzem a produção de citocinas e alteram o potencial

supressivo terapêutico dessas células (LOMBARDO; DELAROSA, 2010). Essas moléculas conhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e, portanto, possuem grande importância na dinâmica do sistema imune inato (PEVSNER-FISCHER et al., 2007).

Além da estratégia de licenciamento, diversos pesquisadores têm buscado por uma terapia conjunta às CTMs, de modo a realçar o potencial imunossupressivo dessas células, sendo as drogas imunossupressoras os principais adjuvantes investigados. Entretanto, os resultados obtidos são extremamente conflitantes. Enquanto alguns autores mostram efeito benéfico nessa estratégia (BURON et al., 2009; SHI et al., 2011), outros enfatizam que as drogas imunossupressoras afetam as propriedades das CTMs e antagonizam seu efeito imunoregulatório (HOOGDUIJN et al., 2008; BURON et al., 2009).

Como pode ser visto, é imprescindível a buscar por uma estratégia que realce o potencial imunossupressor das CTMs, seja por licenciamento ou por uso de adjuvante. O aumento da capacidade imunomoduladora das CTMs diminuiria a necessidade de se ter um grande número de células para uso clínico e, certamente, implicaria na obtenção de resultados mais homogêneos.

1.2 Catelicidina LL-37

LL-37, um peptídeo formado a partir de um pré-peptídeo inativo chamado hCAP18, possui atividade antimicrobiana e é produzido por diversos tipos celulares, como neutrófilos, monócitos, linfócitos e células epiteliais (GUDMUNDSSON et al., 1996; FROHM et al., 1997; SØRENSEN et al., 1997). Além de desempenhar potente atividade bactericida, recentes estudos

demonstraram que LL-37 atua em uma série de outras funções envolvidas na resposta imunológica inata, como na quimiotaxia de monócitos, linfócitos T e neutrófilos, e modula a expressão de citocinas e quimiocinas de macrófagos e células dendríticas (KANDA et al., 2010).

É importante notar que o peptídeo LL-37 pode apresentar papel anti-inflamatório (AMATNGALIM et al., 2011; KOZIEL et al., 2014) e, em outros contextos, pró-inflamatório (YOSHIOKA et al., 2008). A deficiência de LL-37 está relacionada ao aumento de susceptibilidade à infecção e a uma variedade de doenças, como síndrome de Kostmann, ulcera crônica e dermatite atópica (MOOKHERJEE et al., 2009). De fato, LL-37 possui elevada atividade anti-inflamatória e encontra-se em níveis elevados em condições inflamatórias e infecciosas. Foi demonstrado que, quando em ambiente inflamatório, esse peptídeo induz as CMSP a produzirem IL-10, um potente fator imunossupressivo (YU et al., 2007).

LL-37 é capaz de exercer função protetiva a camundongos com sepse, tratados com LPS. Do mesmo modo, LL-37 foi capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por CMSP humanas estimuladas com LPS (SCOTT et al., 2002; DOES, VAN DER et al., 2010). Além disso, há evidências de que dentre os mecanismos utilizados por LL-37 para inibir a sepse estão: inibição da transcrição de genes pró-inflamatórios; ativação da transcrição de genes anti-inflamatórios como IL-10; e interação direta com LPS, o que impede a sinalização de RTT4 (HILCHIE et al., 2013). Em conjunto, esses achados demonstram que esse peptídeo pode ser uma importante ferramenta para inibir a resposta pró-inflamatória.

Recentemente, a relação entre LL-37 e CTMs passou a ser investigada. Foi demonstrado que as CTMs são capazes de produzir LL-37 e que esse mecanismo é importante para que essas células exerçam seu efeito antibacteriano (KRASNODEMBSKAYA et al., 2010). Esse peptídeo exerce um efeito quimiotático para as CTMs; exames histológicos demonstraram que tumores de ovário, mama e pulmão secretam LL-37, e que esse peptídeo é responsável pela atração de CTMs para a massa tumoral e, conseqüente, pelo imunoescape do tumor, através dos mecanismos imunossupressores das CTMs (COFFELT et al., 2009). A ação anti-inflamatória desse peptídeo poderia ser útil como adjuvante do efeito imunorregulador dessas células. Por outro lado, a ação inflamatória desse peptídeo poderia realçar o potencial supressivo das CTMs, uma vez que a exposição previa dessas células a ambientes inflamatórios realça seu potencial supressivo (ENGLISH et al., 2007).

Alguns peptídeos endógenos sinalizam as células através do receptor do peptídeo formil like 1 (FPRL1) e permitem que essas células adentrem os locais de inflamação. Esse receptor é expresso na membrana das CTMs, o que sugere a possibilidade de peptídeos induzirem a migração dessas células para os sítios de inflamação (VISWANATHAN et al., 2007).

Como pode ser visto, vários aspectos reforçam a necessidade de se investigar o efeito combinado das CTMs com LL-37 sobre o sistema imunológico. Especialmente pelo fato de que alguns estudos apontam que há mecanismos supressivos em comum entre as CTMs e LL-37, como inibir genes pró-inflamatórios e promover a transcrição de genes anti-inflamatórios.

II-OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do peptídeo LL-37 sobre a proliferação, migração e potencial supressivo das CTMs.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente CTMs obtidas de placenta;
- Avaliar a influência do peptídeo LL-37 na migração das CTMs;
- Avaliar a influência do peptídeo LL-37 na proliferação celular das CTMs;
- Avaliar o efeito do uso combinado de CTMs e LL-37 sobre a proliferação linfocitária estimulada com fitohemaglutinina;
- Avaliar o efeito supressivo das CTMs previamente tratadas com LL-37 sobre a proliferação linfocitária;
- Avaliar o efeito do LL-37 sobre a proliferação das CMSP;
- Avaliar a influencia de LL-37 sobre a expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs;
- Avaliar o perfil de expressão gênica das CTMs tratadas com LL-37.

III-MATERIAL E MÉTODOS

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)

Nesse projeto foram utilizadas CTMs de placenta, cedidas pelo Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, pesquisador da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto-USP. O uso científico dessas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto (projeto: “Isolamento e Caracterização de Células Progenitoras Mesenquimais de Diferentes Tecidos.” Processo HCRP no 4855/2004). A execução do projeto foi aprovada no Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, processo 35640514.5.3001.5440.

Para coleta e isolamento das CTMs, foram utilizadas amostras de placentas de parturientes saudáveis, conforme protocolo descrito anteriormente (FUKUCHI et al., 2004). Em suma, as placentas foram dissecadas cuidadosamente e os fragmentos de tecidos foram lavados sucessivamente com tampão PBS. Após, os fragmentos foram triturados mecanicamente e foi realizada digestão enzimática utilizando-se 0,25% tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C. O material biológico foi, então, centrifugado e o pellet ressuspenso em meio alpha-mem suplementado com 15% de SFB, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 g/mL de estreptomicina. As células obtidas foram mantidas em cultura em estufa de 5% de CO₂ a 37°C, obtendo-se, por adesão, as CTMs.

As CTMs foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75 cm² (Falcon; Franklin Lakes, NJ) em meio alfa-mínimo essencial (alpha-MEM, Minimum Essential Medium) suplementado com 100 µg/ml penicilina, 100µg/ml

estreptomicina, 2mM L-glutamina, e 15% de soro bovino fetal. Após o período de expansão, quando atingida confluência de cerca de 90% na garrafa de cultivo, as células foram colhidas por tripsinização utilizando-se uma solução 0,2% tripsina-EDTA. Nesse estudo utilizou-se 3 amostras de CTMs, em 4-6 passagem.

3.2 Caracterização imunofenotípica e diferenciação das CTMs

Para cumprimento dos critérios de classificação das CTMs, estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, as células utilizadas nesse estudo foram caracterizadas imunofenotipicamente por Citometria de Fluxo, pela utilização dos anticorpos CD73, CD90, CD29, CD13, CD44, CD49e, HLA-class I, CD34, CD14, CD45, CD31 e HLA-class II (BD Pharmingen). Além disso, também foi realizada a caracterização funcional dessas células, pela diferenciação celular osteoblástica, com dexametasona e ácido ascórbico e, em adipócitos, com insulina, dexametasona e indometacina, conforme descrito anteriormente (SALDANHA-ARAUJO et al., 2011).

3.3 Ensaio de viabilidade/proliferação das CTMs por MTT

A proliferação das CTM foi avaliada por ensaio de MTT. Nesse estudo, avaliamos o efeito de LL-37 como licenciador e como estimulante contínuo das CTMs. Em suma, foram plaqueadas 2×10^3 CTMs em placa de 96 poços, contendo 100 μ L de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As CTMs foram licenciadas por 48h com 1 ou 10 μ g/ml de LL-37, ou tratadas com essas

concentrações de peptídeo durante os 5 dias de experimento. Nos grupos em que as CTMs foram licenciadas, após 48 horas desse tratamento com LL-37, o meio de cultivo, contendo LL-37, foi retirado da placa, os poços lavados com tampão PBS e novo meio RPMI contendo 10% de SFB foi adicionado ao cultivo celular. O material foi mantido em estufa de 5% de CO₂ a 37°C, sendo a viabilidade/migração analisada nos dias 1 (dia seguinte ao plaqueamento), dia 3, 5 e 7 do cultivo.

Nos dias de análise foi adicionado aos 100 µl de meio RPMI, 20 µl de MTT em cada poço, as placas foram envolvidas em papel alumínio e mantidas durante 4 horas na estufa. Após esse período, o meio foi removido, foram adicionados 200 µl de DMSO e a placa colocada em bandeja agitadora durante 15 minutos. Findado esse tempo, foi realizada leitura da absorbância em 570 nm na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter).

3.4 Ensaio de migração das CTMs pela técnica de “*wound scratch assay*”

Para avaliar o potencial de migração, seguimos o protocolo de LIANG et al., (2007). As CTMs foram plaqueadas em placas de 6 poços, contendo 1,5 mL de meio alpha-MEM suplementado com 15% de SFB. Esse ensaio envolveu os grupos CTMs (controle), CTMs licenciadas com LL-37 (1 ou 10 µg/ml) e CTMs tratadas com LL-37 (1 ou 10 µg/ml).

Após o plaqueamento das CTMs, dois grupos (1 e 10 µg/ml) receberam licenciamento de LL-37 por 48h e, após esse período, todos os grupos, licenciados ou não, tiveram os meios removidos da placa. Posteriormente, os poços foram lavados por 3 vezes para que a LL-37 fosse completamente

removida. Nesse ponto, realizou-se um risco no fundo dos poços com uso de uma ponteira p200 que serviu como área de análise da migração das CTMs. Após a execução do risco, as células foram novamente lavadas para retirar eventuais restos celulares e novo meio de cultivo foi adicionado, sendo colocado junto a LL-37 (1 ou 10 µg/ml) nos grupos em que esse peptídeo permanecia durante todo o ensaio.

O cultivo celular foi acompanhado e uma mesma região determinada de cada risco foi fotografada nos tempos 0, 48 e 96 horas, por uso de máquina fotográfica acoplada ao microscópio invertido Primo Vert (Carl Zeiss). Foi realizada a aferição da área a ser preenchida nos diferentes tempos com auxílio do *software ImageJ (National Institutes of Health)*, de modo a mensurar a porcentagem de redução de área nos diferentes grupos experimentais. Em todos os grupos experimentais, o meio utilizado era livre de SBF para que não houvesse estímulo à proliferação celular.

3.5 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

As CMSP foram isoladas por uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), a partir de amostras de sangue periférico coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA.

Para isso, foi colocado em cada tubo cônico de 15 ml, 4 ml de sangue, 4 ml de PBS e 3 ml de Ficoll-Paque, estando todos os reagentes a temperatura ambiente. Os tubos cônicos contendo as amostras foram centrifugados a 400 g durante 25 minutos, o que permitiu a obtenção de um halo de células mononucleares. O halo foi separado com auxílio de uma pipeta pasteur, sendo

passado para tubos cônicos de 50 ml, onde foi lavado com PBS. Foram realizadas três lavagens das CMSP, até que o pellet celular foi ressuspendido em 1 ml de PBS com 10% de SFB para a marcação com CFSE. Para esta marcação, foi pipetado 4 µL de CFSE na suspensão celular e as células foram mantidas durante 7,5 minutos a 37°C, em banho-maria. Após esse período, a marcação foi interrompida pela adição de 10 ml de RPMI gelado contendo 10% de SFB, mantendo-se a amostra refrigerada por 5 minutos. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS, através da centrifugação da amostra a 1200 rpm durante 5 minutos e descarte do sobrenadante. Por fim, o botão celular obtido foi ressuspendido em 1 ml de meio RPMI, contendo 10% de SFB, e essas células utilizadas em ensaios de cocultivo com CTMs.

3.6 Ensaio de imunossupressão das CTMs sobre CMSP por CFSE

Para a padronização dos cocultivos entre CTMs e CMSP e avaliação da capacidade supressiva das CTMs, realizamos ensaios de proliferação com relação CTM:CMSP 1:5, 1:10 e 1:25. Para ativação dos linfócitos, as CMSP foram tratadas com 10 µg/ml de fitohemaglutinina, sendo a proliferação linfocitária avaliada ao 5º dia de cocultivo, por uso do Citômetro de Fluxo FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

3.7 Influência de LL-37 no efeito anti-proliferativo das CTMs sobre linfócitos T

Para avaliar se LL-37 poderia ter um papel como adjuvante sobre o efeito anti-proliferativo que as CTMs exercem sobre os linfócitos, adicionamos esse peptídeo ao cocultivo de CTMs-CMSP no dia 1 da cocultura e, alternativamente, no 3 dia do experimento. Em suma, foram plaqueadas, em triplicata, $3,5 \times 10^4$ CTMs em placa de 96 poços e, 24h após, adicionou-se $3,5 \times 10^5$ CMSP, previamente marcadas com CFSE e ativadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina. Em dois grupos experimentais, foi adicionado 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37. Para outros grupos experimentais, o procedimento de adição de peptídeo ocorreu apenas no terceiro dia do experimento. Ao quinto dia do ensaio, as CMSP foram coletadas e transferidas para microtubos de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, sendo obtido um botão celular, que foi ressuscitado em 30 μl de PBS e as células marcadas com anti-CD3 APC (Thermo Fisher), seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras foram marcadas, incubadas durante 20 minutos em ambiente escuro e, posteriormente, centrifugadas e ressuscitadas em 250 microlitros de PBS 4% formaldeído. A proliferação celular foi avaliada no Citômetro de Fluxo FACSVerse.

3.8 Ensaio de proliferação de linfócitos T mediante presença de LL-37 por CFSE

Afim de avaliar a influência de LL-37 sobre a proliferação de linfócitos ativados com fitohemaglutinina, CMSP foram isoladas por gradiente de Ficoll e mantidas em cultivo em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. $3,5 \times 10^5$ CMSP foram ativadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina e receberam 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de peptídeo LL-37, durante 5 dias. Em outro grupo experimental, o peptídeo LL-37 foi adicionado ao cultivo celular apenas no terceiro dia de experimento. As CMSP foram plaqueadas em triplicata para cada condição. Ao fim do quinto dia, as células foram coletadas e marcadas com o anticorpo anti-CD3 APC e a proliferação celular foi analisada no Citômetro de Fluxo FACSVerse.

3.9 Licenciamento das CTMs por LL-37

Para analisar o efeito de LL-37 sobre o licenciamento das CTMs, foi avaliada a capacidade dessas células em suprimir a proliferação dos linfócitos, quando previamente tratadas por 48 h com 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37. Para isso, $3,5 \times 10^4$ CTMs foram tratadas com 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37 e cultivadas em 200 μL de RPMI 10% SFB em placas de 96 poços, por 48 h. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, os poços lavados 3 vezes com PBS e adicionados novamente de meio RPMI com 10% de SFB. Em seguida, adicionou-se CMSP previamente marcadas com CFSE e ativadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina. Ao quinto dia de experimento, as CMSP foram recolhidas e submetidas a análise de proliferação celular no Citômetro FACSVerse.

3.10 Expressão de RTT3 e RTT4 em CTMs por Citometria de Fluxo

A avaliação da influência do peptídeo LL-37 sobre a expressão dos RTT das CTMs foi realizada por Citometria de Fluxo, através do uso dos anticorpos anti-RTT3 e anti-RTT4. Em suma, $1,75 \times 10^5$ CTMs foram plaqueadas em placa de 24 poços, tratadas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37 e cultivadas em 1 mL de meio de cultivo alpha-MEM 15%SBF, por 48 h. Após esse período, as CTMs foram recolhidas, acondicionadas em microtubos e submetidas a marcação com anticorpos anti-RTT3 e anti-RTT4 conjugados a PE (eBioscience). Para marcação de RTT3, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas por uso do *Kit Citofix Citoperm* (BD Bioscience). As marcações ocorreram por incubação com os anticorpos por um período de 20 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas e analisadas no Citômetro de Fluxo FacsCalibur (Hemocentro de Ribeirão Preto/ FMRP-USP). Em todas as análises foram obtidos 20.000 eventos.

3.11 PCR em tempo real

O perfil de expressão de genes relacionados a resposta imune foi avaliado por PCR em tempo real, em CTMs tratadas ou não por 48 h com 10 μg de LL-37. Após esse licenciamento, as CTMs foram recolhidas por tripsinização, lavadas e ressuspendidas em PBS. Essas amostras foram submetidas a extração de RNA por uso do RNeasy mini kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Em suma, as CTMs coletadas foram submetidas a lise pelo tampão RLT e, posteriormente, foi adicionado etanol as amostras. Esse material foi aplicado na coluna fornecida pelo *kit*, onde o RNA ficou

aderido a membrana e os contaminantes foram eliminados por lavagem com os tampões RW1 e RPE. Após a obtenção do RNA, procedemos a análise da qualidade e quantidade desse material, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop da Universidade Católica de Brasília. Posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA, por uso do *High Capacity cDNA Archive Kit* (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante.

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada pela metodologia TaqMan (Thermo Fisher), cujos primers e sondas foram adquiridos pelo sistema *AssayOnDemand*. O gene calibrador utilizado foi a B-actina, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilita a análise pela metodologia de $\Delta\Delta C_t$ (PFAFFL, 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Analisamos a expressão dos genes TNF (Hs01113624), TGF- β (Hs00998133), IL-6 (Hs00985639), IDO (Hs00984148), Galectina 1 (Hs00355202), IL-1 (Hs00174097) e IL-10 (Hs00961622), utilizando TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher) no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (ThermoFisher).

IV-RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1 Fenotipagem e diferenciação das CTMs

As três CTMs de placenta utilizadas nesse estudo apresentaram padrão imunofenotípico clássico de CTMs, com positividade para os marcadores CD73, CD29, CD90, CD44, CD149E, CD13 e HLA-I. Como esperado, as células não apresentaram expressão dos marcadores CD45, CD34, CD31, CD14 e de HLA-DR (Figura 1).

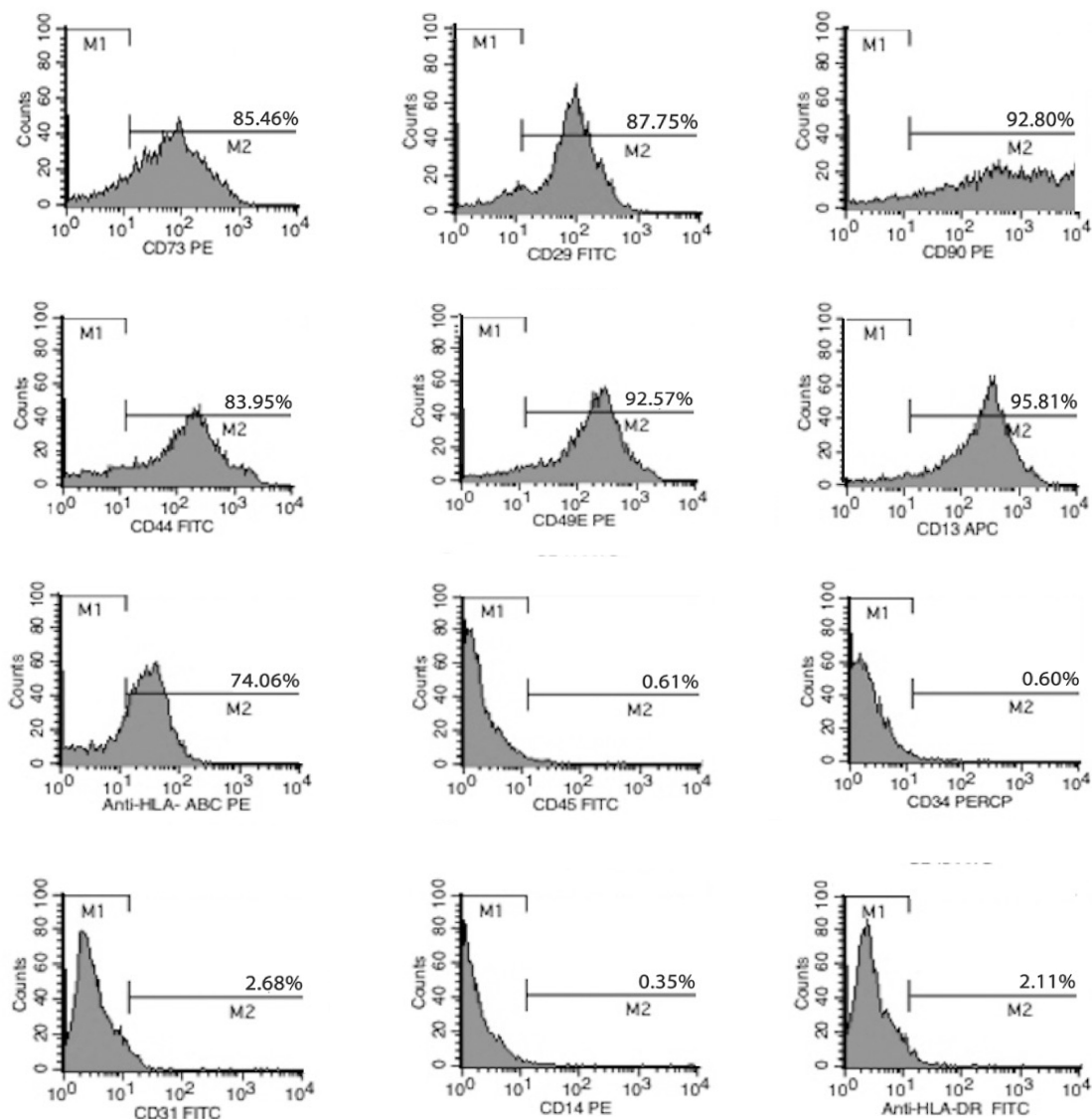


Figura 1. Fenotipagem das CTMs por Citometria de Fluxo. Os resultados são representativos de uma das CTMs utilizadas no estudo.

As CTMs utilizadas apresentaram capacidade de se diferenciar em adipócitos (figura 2A) e osteócitos (figura 2B).

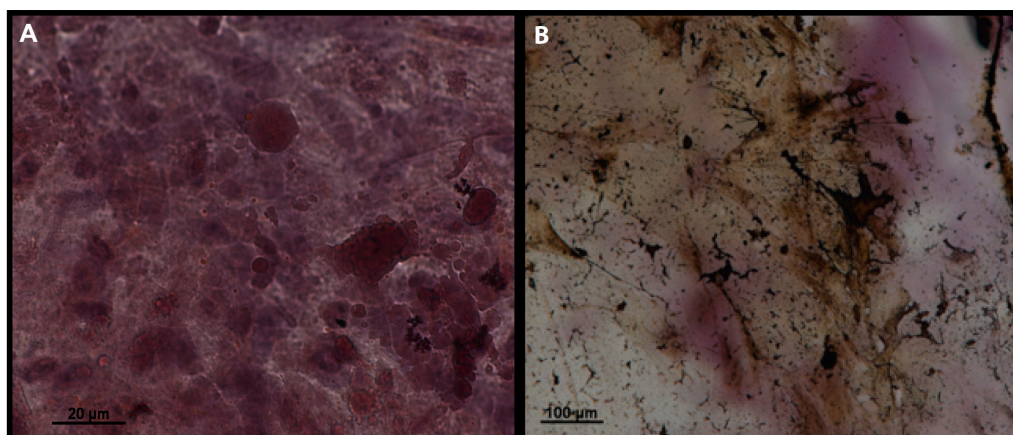


Figura 2. Diferenciação funcional de CTMs. A) Adipócitos corados com Oil Red. B) Osteócitos corados com Alizarina Red.

4.2 LL-37 não induz a proliferação de CTMs

O tratamento das CTMs com LL-37 não alterou a proliferação nem a viabilidade dessas células, como pode ser visto na figura 3.

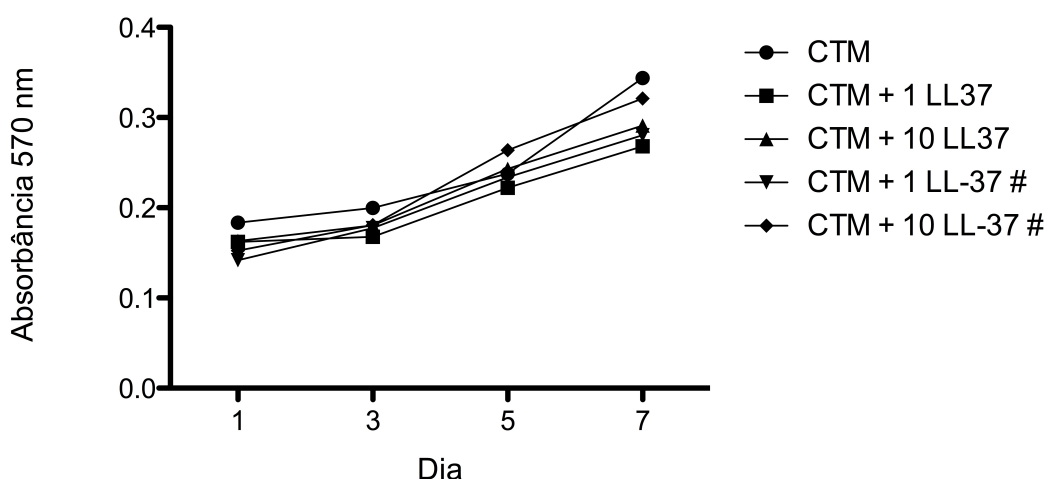
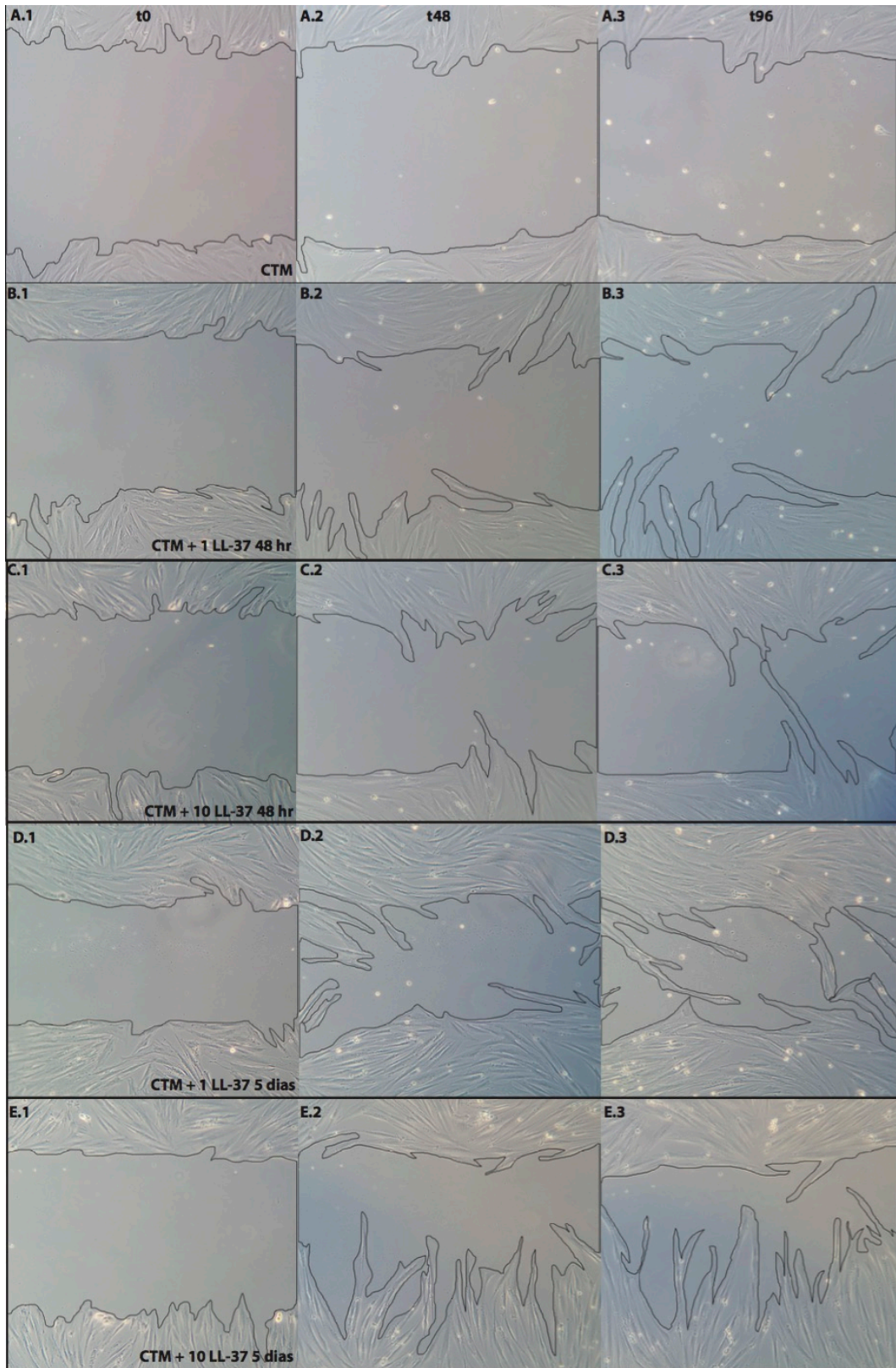


Figura 3. Análise de Viabilidade/Proliferação Celular. CTMs foram licenciadas com LL-37 por 48h (CTM + 1 LL-37 e CTM +10 LL-37) ou permanecerem com esse peptídeo durante todo o período do ensaio (CTM + 1 LL-37# e CTM + 10 LL-37#). Os valores são representados como média de uma triplicata. LL-37 não induziu alteração na proliferação celular. Grupos independentes foram avaliados por teste t não-pareado.

4.3 LL-37 acentua o potencial migratório de CTMs

As CTMs em presença constante do peptídeo LL-37 apresentaram maior capacidade migratória (figuras 4D e 4E), quando comparadas com células que não entraram em contato com o peptídeo (figura 4A) ou que estiveram sob licenciamento durante o período de 48 horas (figuras 4B e 4C). A observação microscópica foi validada pela análise de área realizada pelo *Software ImageJ* (figuras 4F e 4G). O tratamento contínuo com LL-37 na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ realçou o potencial migratório das CTMs em comparação com as CTMs não tratadas (média 67% vs 83%, $p=0,007$). Do mesmo modo, o tratamento contínuo das CTMs com 10 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37 realçou a migração das CTMs, em comparação com as CTMs controle (média 63% vs 83%, $p=0,009$).



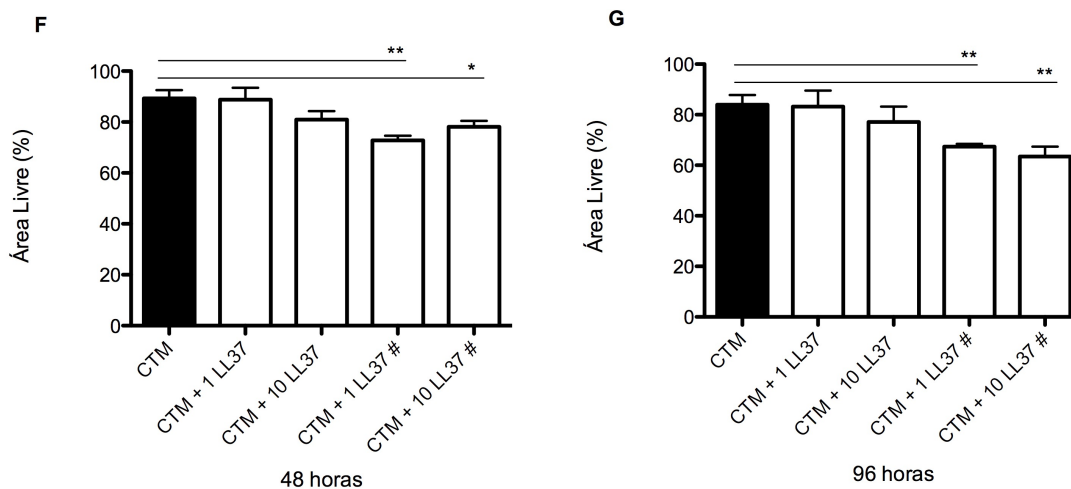


Figura 4. Migração das CTMs. A1, A2 e A3) Migração de CTMs no período de 0, 48 e 96 horas, respectivamente. B1, B2 e B3) Migração de CTMs nos tempos 0, 48 e 96 horas após licenciamento com 1 µg/ml de LL-37. C1, C2 e C3) Migração de CTMs nos tempos 0, 48 e 96 horas após licenciamento com 10 µg/ml de LL-37. D1, D2 e D3) Migração de CTMs que permaneceram em contato com 1 µg/ml durante todo o ensaio, nos tempos 0, 48 e 96 horas. E1, E2 e E3) Migração de CTMs mantidas em contato com 10 µg/ml de LL-37 durante os 5 dias de experimento, nos tempos 0, 48 e 96 horas. F) Porcentagem de área livre após a migração das CTMs em 48 horas. G) Porcentagem de área livre em 96 horas. Os grupos que receberam LL-37 durante todo ensaio estão identificados com #. Os grupos independentes foram avaliados por teste t não-pareado. *p < 0.05. **p < 0.01.

4.4 CTMs inibem a proliferação de CMSP

As CTMs de placenta foram capazes de suprimir a proliferação dos linfócitos T, de maneira dose dependente, em proporções 1:5 (p<0,0001), 1:10 (p=0,0001) e 1:25 (p=0,0001) (Figura 5A e 5B).

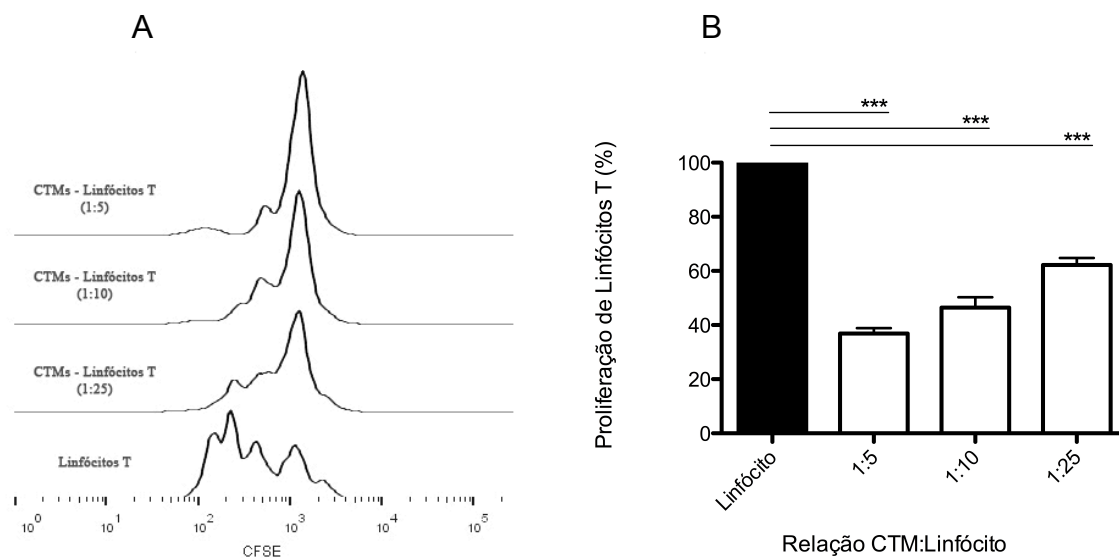


Figura 5. Ensaio de Proliferação de linfócitos. A) Histograma de CMSP marcadas com CFSE, ativadas com fitohemaglutinina e submetidas ao cocultivo por 5 dias com CTMs em diferentes concentrações. B) Representação gráfica da proliferação celular avaliada por Citometria de Fluxo, sendo a divisão dos linfócitos cultivados isoladamente ajustada para 100%. O símbolo *** indica $p < 0,001$. Grupos independentes foram avaliados pelo teste t não pareado.

4.5 LL-37 realça o potencial supressivo das CTMs sobre linfócitos T

A adição do peptídeo LL-37 no primeiro dia do cocultivo entre CTMs-CMSP não influenciou na proliferação dos linfócitos T. Entretanto, esse peptídeo levou à maior supressão da proliferação dos linfócitos T cultivados com CTMs, quando adicionado nas concentrações de 1 ($p=0,001$) e 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,007$) no terceiro dia do experimento (Figura 6).

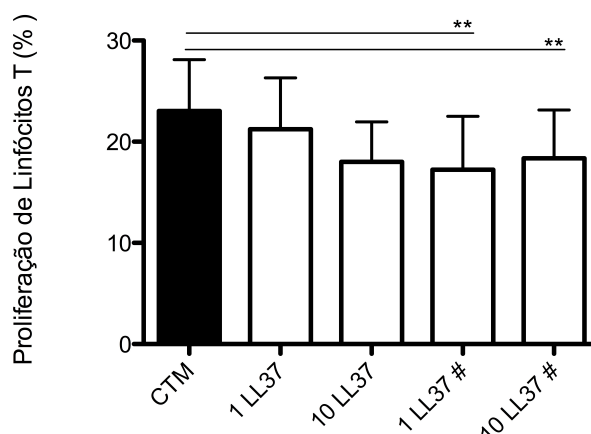


Figura 6. Proliferação de linfócitos cultivados com CTMs. O cocultivo de CMSP com CTMs recebeu adição de 1 ou 10 µg/ml de LL-37 no primeiro dia de cultura ou ao terceiro dia (#). Grupos independentes foram analisados pelo teste t pareado. **p < 0.01.

4.6 LL-37 acentua a proliferação de linfócitos T ativado

A adição de LL-37 na concentração de 1 (p=0,01) ou 10 µg/ml (p=0,04) no primeiro dia e de 10 µg/ml no terceiro dia (p=0,002) de cultivo foi capaz de induzir um aumento significativo da proliferação dos linfócitos T (Figura 7), quando comparado com as CTMs não tratadas com o peptídeo.

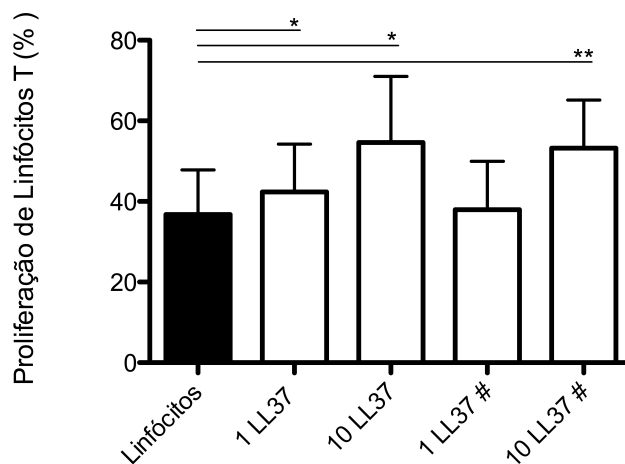


Figura 7. Proliferação de Linfócitos T. Na concentração de 1 e 10 µg/mL, LL-37 aumentou a proliferação de linfócitos T. Os grupos que receberam LL-37 no terceiro dia foram identificados por #. Grupos independentes foram avaliados pelo t pareado. *p < 0.05. **p < 0.01.

4.7 LL-37 não licencia as CTMs

O licenciamento por 48 horas com 1 ou 10 µg/ml de LL-37, não potencializou o efeito supressivo das CTMs, comparadas as células não tratadas com o peptídeo ($p>0,05$) (Figura 8).

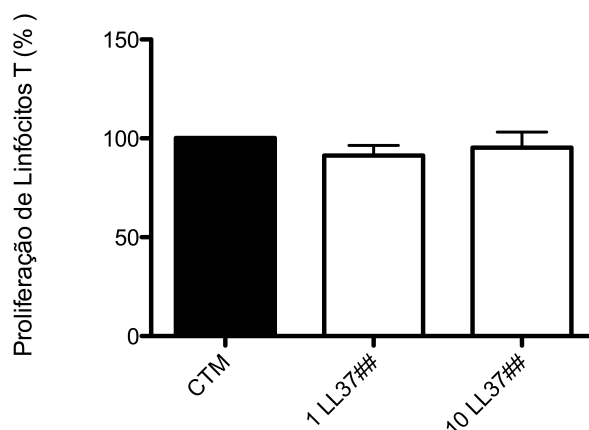


Figura 8. Proliferação de linfócitos cultivados com CTMs licenciadas. As CTMs foram tratadas com 1 ou 10 µg/ml de LL-37 por 48 horas (##) e a proliferação de linfócitos avaliada após 5 dias de cocultivo. A proliferação de linfócitos no grupo controle foi ajustada para 100%. A análise estatística foi realizada pelo teste t não pareado.

4.8 LL-37 modula a expressão de RTT3 e não modula a expressão de RTT4 em CTMs

O tratamento das CTMs com o peptídeo LL-37 por 48 horas foi capaz de aumentar a expressão de RTT3, quando comparado com as CTMs não tratadas com esse peptídeo (média 35,3 vs 41,86; $p=0,04$). O licenciamento com LL-37 não exerceu influência na expressão de RTT4 ($p=0,21$) (Figura 9).

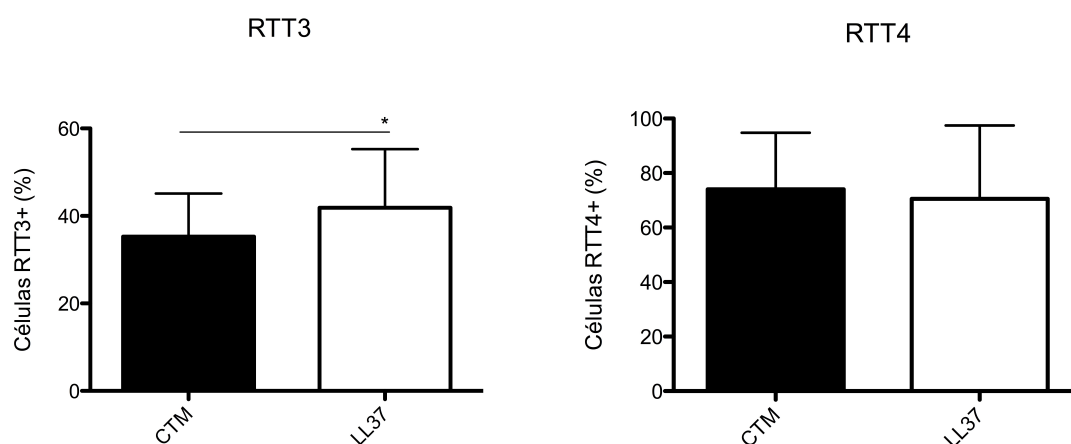


Figura 9. Expressão de RTT em CTMs. A expressão de RTT3 e RTT4 foi avaliada por Citometria de Fluxo em CTMs oriundas de 3 placentas diferentes, tratadas ou não com LL-37. O símbolo * significa $p < 0,05$. Os dados obtidos foram analisados pelo teste t pareado.

4.9 Perfil de expressão gênica das CTMs

Comparado às CTMs controle, o tratamento das CTMs com 10 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37 aumentou a expressão dos genes IL-10 ($p=0,008$), IL-6 ($p=0,007$), IDO ($p=0,004$), TGF- β ($p=0,02$) e IL-1 ($p=0,03$) (Figura 10).

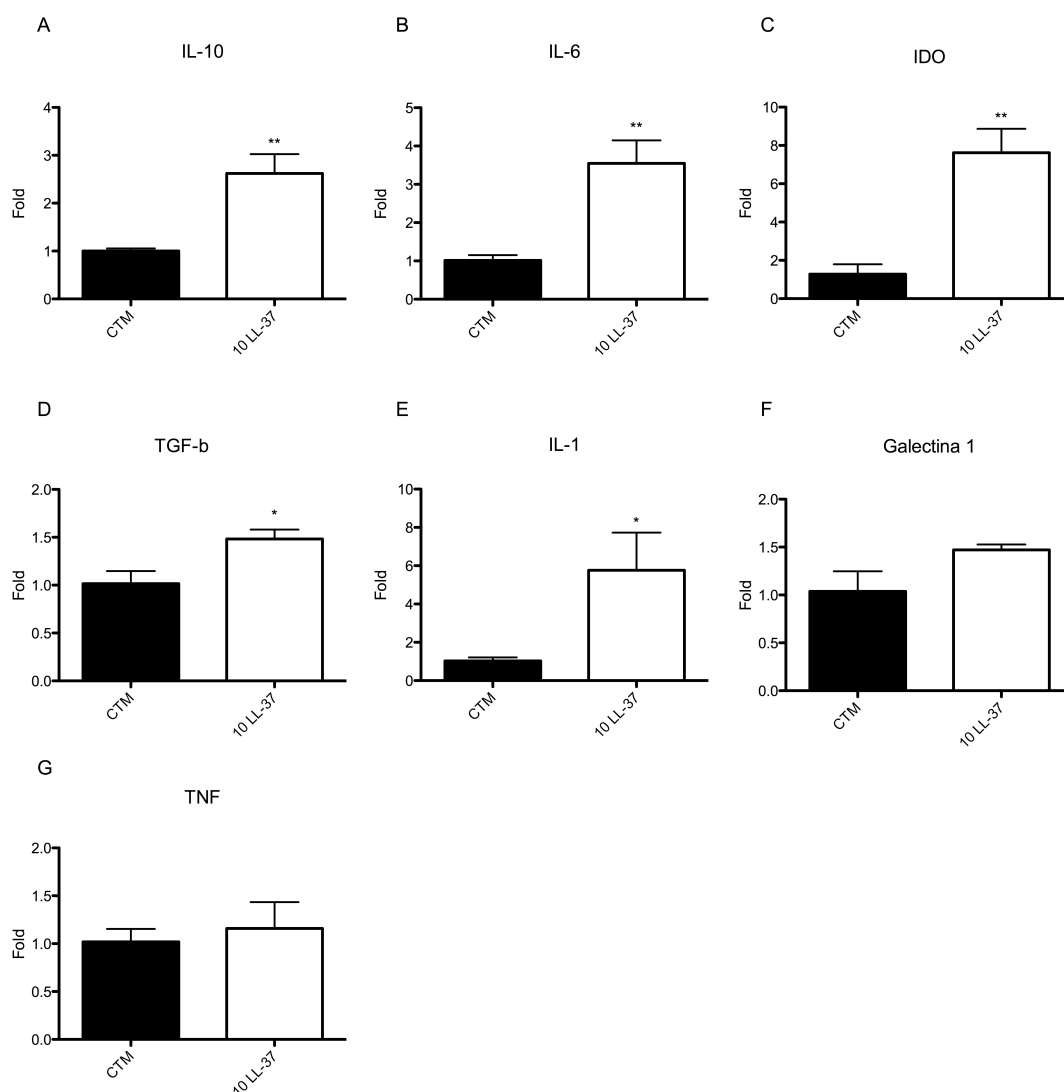


Figura 10. Expressão gênica das CTMs. Por PCR em tempo real foi avaliada expressão dos genes IL-10 (A), IL-6 (B), IDO (C), TGF- β (D), IL-1 (E), Galectina 1 (F) e TNF (G) em CTMs tratadas com 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de LL-37. Os dados obtidos foram analisados pelo teste t não-pareado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

V-DISSCUSSÃO

5.DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que o peptídeo LL-37 é capaz de realçar o efeito imussupressor de CTMs sobre linfócitos T, além de aumentar o potencial migratório das CTMs. Evidenciamos também que LL-37 modula a expressão de RTT3 e a expressão dos genes IL-10, IDO, IL-6, IL-1b e TGF-b nas CTMs.

As CTMs de placenta apresentaram efeito supressor dose dependente sobre linfócitos, assim como já havia sido descrito para CTMs de medula óssea (NICOLA, DI et al., 2002). O fato de se obter maior potencial supressivo quando se tem maior número de CTMs, torna interessante a elaboração de uma estratégia que fosse capaz de realçar o potencial de proliferação das CTMs. Foi demonstrado que as CTMs podem ter a proliferação aumentada em presença do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), sem que a diferenciação das CTMs fosse induzida (TAMAMA et al., 2010). Nos resultados obtidos nesse trabalho, não observamos efeito de LL-37 sobre a proliferação das CTMs, embora esse peptídeo tenha estimulado a proliferação celular em outros modelos de células, como em células endoteliais humanas obtidas de veia de cordão (HUVEC) (LEE et al., 2008) e em células epiteliais de um estudo de cicatrização de feridas (SHAYKHIEV et al., 2005).

Uma importante propriedade das CTMs, principalmente em patologias que acometem diversos órgãos e tecidos distantes, é o seu potencial de migração, uma vez que essas células possuem tropismo por ambientes inflamatórios, como órgãos e tecidos lesionados, e lá exercem seu potencial imunomodulatório (SOHNI; VERFAILLIE, 2013). Nesse estudo, demonstramos que LL-37 é capaz de realçar o potencial migratório das CTMs. Entretanto, esse efeito não foi observado pelo licenciamento das CTMs, e só ocorreu

quando essas células foram mantidas em contato permanente com o peptídeo. Este resultado corrobora com autores que, em 2002, haviam identificado que o peptídeo LL-37 induzia a migração de mastócitos (NIYONSABA et al., 2002). Além disso, Coffelt e colaboradores (2009) descreveram a ocorrência de progressão tumoral sob influência de LL-37 em virtude desse peptídeo aumentar o potencial migratório e o recrutamento de CTMs no ambiente tumoral. Nesse estudo, os autores mostraram que a migração é realçada pela sinalização do receptor FPRL1, uma vez que a inibição de sua sinalização causou uma redução significativa do potencial migratório das células. Nessa linha, foi demonstrado ainda que LL-37 é capaz de atuar como ligante de CXCR2 e estimular a migração de neutrófilos (ZHANG et al., 2009; POUND et al., 2015). Em estudos pregressos com CTMs cultivadas na presença de IL-6, houve um aumento da expressão do receptor de quimiocinas (CXCR4), bem como um incremento do potencial migratório das células (SOHNI; VERFAILLIE, 2013). Outro mecanismo de ação descrito é que LL-37 realça o potencial de migração celular por ativar RRT3 em CTMs (TOMCHUCK et al., 2008). Nossos resultados estão em linha com esses achados, sendo que LL-37 induziu um aumento na expressão de RRT3 e também de IL-6 nas CTMs, o que em parte, pode explicar o aumento observado do potencial migratório.

Nesse estudo, notamos que LL-37 acentua a inibição da proliferação de linfócitos T cultivados com CTMs, especialmente, quando adicionado no decorrer do cocultivo, em que as CTMs já se encontram atuando no controle da proliferação dos linfócitos T. A adição previa de LL-37, no primeiro dia do cocultivo de CTMs e CMSP, apesar de não ter resultado em diferença estatisticamente significativa, realçou o efeito anti-proliferativo sobre os

linfócitos T em 20%. Para investigar se o efeito observado era oriundo de uma atuação direta de LL-37 sobre linfócitos T, investigamos o efeito desse peptídeo em cultura com CMSP ativadas com fitohemaglutinina. Surpreendentemente, quando o peptídeo LL-37 foi adicionado a cultura de CMSP ativadas com fitohemaglutinina, observamos exacerbação da proliferação dessas células, o que indica que LL-37 modula as CTMs e que o efeito desse peptídeo é dependente do microambiente em que ele se encontra. De fato, tem sido demonstrado que LL-37 pode seletivamente realçar a resposta imune quando está em ambiente inflamatório ou infeccioso (YU et al., 2007).

Foi demonstrado que a ativação de RTT podem polarizar as CTMs, sendo que a ativação de RTT3 acentua o potencial anti-inflamatório dessas células, enquanto que a sinalização de RTT4 torna as CTMs pró-inflamatórias (WATERMAN et al., 2010). Nesse sentido, diversos autores mostraram que o peptídeo LL-37 é capaz de provocar ativação de RTT3 (LAI et al., 2011; SINGH et al., 2013). Além disso, a ativação de RTT3 pode ser acessada, *in vitro*, pelo aumento na produção de IL-6 (KANDLER et al., 2006; FILEWOD et al., 2009; LAI et al., 2011). De acordo com esses achados, nossos resultados mostram que o condicionamento das CTMs com LL-37 aumentou a expressão de RTT3, de IL-6 e realçou a capacidade imunossupressiva dessas células.

Além disso, o tratamento das CTMs com LL-37 induziu o aumento na expressão de fatores que fazem parte dos mecanismos pelo qual as CTMs imunorregulam os linfócitos T, como IL-10 (YANG et al., 2009), IDO (MEISEL et al., 2004) e TGF- β (NICOLA, DI et al., 2002).

Outro resultado interessante observado, foi o aumento da expressão de IL-1, descrita principalmente como uma citocina inflamatória. Um estudo com CTMs diferenciadas em células endoteliais também obteve um aumento da expressão de IL-1 em cocultivos com linfócitos T ou células NK, sugerindo um possível envolvimento dessa citocina com imunossupressão de células imunes alogênicas (OMAR, EL et al., 2015). Além disso, foi demonstrado anteriormente, em um modelo de colite, que o pré-tratamento de CTMs com IL-1 aumentou a eficácia do *homing* celular (SOHNI; VERFAILLIE, 2013).

Um aspecto importante é que os resultados obtidos nesse estudo indicam que LL-37 pode atuar em outro mecanismo de imunorregulação exercido pelas CTMs; na geração de linfócitos regulatórios, haja vista que TGF- β , cujo aumento foi observado em nosso estudo, tem papel central nessa indução (MACCARIO et al., 2005).

É importante notar que o licenciamento das CTMs com LL-37 não realçou nenhuma propriedade biológica dessas células e que, o aumento do potencial migratório e da capacidade supressiva observados são dependentes de um contato permanente de LL-37. Esse resultado é particularmente interessante, pois atualmente tem-se procurado por drogas que possam ter efeito sinérgico às CTMs no contexto do controle da resposta imune. Como mencionado anteriormente, os estudos com imunossupressores são contraditórios, o que torna importante a busca por estratégias alternativas.

Demonstramos claramente nesse trabalho que o peptídeo LL-37 é capaz de realçar o efeito supressivo das CTMs quando usado como adjuvante. Ademais, fornecemos importantes informações com relação ao mecanismo de ação de LL-37, que atua tanto sinalizando RTT3, como induzindo o aumento na

expressão de fatores anti-inflamatórios pelas CTMs. Esses achados são extremamente importantes na linha em que se inserem, especialmente, pelo fato de que LL-37, além de garantir potencialização na migração e no efeito supressor das CTMs, atuar no combate a microorganismos oportunistas, que configuram uma grande ameaça aos pacientes com DECH. Outro ponto que merece destaque é o fato de que LL-37 pode atuar neutralizando o efeito deletério de possíveis produtos bacterianos sobre a capacidade imunossupressora das CTMs (TOMCHUCK et al., 2008). Seria importante, nesse ponto, a realização de estudos em modelo animal, de modo a investigar os efeitos de LL-37 em um cenário mais complexo e fisiológico. Esses resultados poderão servir de base para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica inovadora, em que a potencialidade das CTMs em controlar a resposta imunológica é realçada e, ao mesmo tempo, se garante um efeito protetivo contra infecções oportunistas, por uso adjuvante de LL-37.

VI- CONCLUSÕES

6.CONCLUSÕES

- CTMs de placenta inibem a proliferação de linfócitos T;
- CTMs de placenta expressam RTT3 e RTT4;
- LL-37 não estimula a proliferação de CTMs de placenta;
- LL-37 estimula a migração de CTMs de placenta;
- LL-37 realça a inibição da proliferação de linfócitos durante o cocultivo dessas células com CTMs, como adjuvante;
- LL-37 estimula a proliferação de linfócitos T.
- LL-37 não licencia CTMs;
- LL-37 modula a expressão de RTT3 em CTMs;
- LL-37 induz o aumento sa expressão de IL-10, TGF- β , IL-1- β e IDO em CTMs.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1823, 2005.

AMATNGALIM, G. D.; NIJNIK, A.; HIEMSTRA, P. S.; HANCOCK, R. E. W. Cathelicidin peptide LL-37 modulates TREM-1 expression and inflammatory responses to microbial compounds. **Inflammation**, v. 34, n. 5, p. 412–425, 2011.

ANTIN, J. H. Acute graft-versus-host disease: inflammation run amok? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 12, 2001.

AULETTA, J. J.; DEANS, R. J.; BARTHOLOMEW, A. M. Emerging roles for multipotent , bone marrow – derived stromal cells in host defense. **Blood**, v. 119, n. 8, p. 1–4, 2012.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 42–48, 2002.

BLANC, K. LE; FRASSONI, F.; BALL, L.; et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579–1586, 2008.

BLANC, K. LE; RINGDE, O. Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. **Journal of Immunology**, p. 11–20, 2003.

BONIN, M. VON; STÖLZEL, F.; GOEDECKE, A.; et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. **Bone marrow transplantation**, v. 43, n. 3, p. 245–251, 2009.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 6, p. 846–58, 2007.

BURON, F.; PERRIN, H.; MALCUS, C.; et al. Human Mesenchymal Stem Cells and Immunosuppressive Drug Interactions in Allogeneic Responses: An In Vitro Study Using Human Cells. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 8, p. 3347–3352, 2009.

CASSATELLA, M. A.; MOSNA, F.; MICHELETTI, A.; et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. **Stem Cells**, v. 29, n. 6, p. 1001–1011, 2011.

CHINNADURAI, R.; IAN B. COPLAND; SEEMA R. PATEL; JACQUES GALIPEAU.IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN- γ – Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1491–1501, 2014.

CHRISTIANE A. OPITZ; LITZENBURGER, U. M.; LUTZ, C.; et al. Toll-Like Receptor Engagement Enhances the Immunosuppressive Properties of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Inducing Indoleamine-2,3-

- dioxygenase-1 via Interferon- β and Protein Kinase R. **Stem Cells**, p. 909–919, 2009.
- COFFELT, S. B.; MARINI, F. C.; WATSON, K.; et al. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. **PNAS**, v. 106, n. 10, p. 3806–3811, 2009.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells : Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, n. p. 875–884, 2000.
- DOES, A. M. VAN DER; BEEKHUIZEN, H.; RAVENSBERGEN, B.; et al. LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature. **Journal of immunology**, v. 185, n. 3, p. 1442–1449, 2010.
- DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.
- ENGLISH, K.; BARRY, F. P.; FIELD-CORBETT, C. P.; MAHON, B. P. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology letters**, v. 110, n. 2, p. 91–100, 2007.
- FILEWOD, N. C. J.; PISTOLIC, J.; HANCOCK, R. E. W. Low concentrations of LL-37 alter IL-8 production by keratinocytes and bronchial epithelial cells in response to proinflammatory stimuli. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 233–240, 2009.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970.
- FROHM, M.; AGERBERTH, B.; AHANGARI, G.; et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 24, p. 15258–15263, 1997.
- FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; et al. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 649–658, 2004.
- GUDMUNDSSON, G. H.; AGERBERTH, B.; ODEBERG, J.; et al. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. **European journal of biochemistry**, v. 238, n. 2, p. 325–332, 1996.
- HILCHIE, A. L.; WUERTEH, K.; HANCOCK, R. E. W. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 12, p. 761–768, 2013.
- HOOGDUIJN, M. J.; CROP, M. J.; KOREVAAR, S. S.; et al. Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells to Tacrolimus, Mycophenolic Acid, and Rapamycin. **Transplantation**, v. 86, n. 9, 2008.
- KANDA, N.; ISHIKAWA, T.; KAMATA, M.; TADA, Y.; WATANABE, S. Increased serum leucine, leucine-37 levels in psoriasis: positive and negative feedback

loops of leucine, leucine-37 and pro- or anti-inflammatory cytokines. **Human immunology**, v. 71, n. 12, p. 1161–71, 2010.

KANDLER, K.; SHAYKHIEV, R.; KLEEMANN, P.; et al. The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. **International Immunology**, v. 18, n. 12, p. 1729–1736, 2006.

KLYUSHNENKOVA, E.; MOSCA, J. D.; ZERNETKINA, V.; et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 1, p. 47–57, 2005.

KOZIEL, J.; BRYZEK, D.; SROKA, A.; et al. Citrullination alters immunomodulatory function of LL-37 essential for prevention of endotoxin-induced sepsis. **Journal of immunology**, v. 192, n. 11, p. 5363–72, 2014.

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

KRASNODEMBSKAYA, A.; SONG, Y.; FANG, X.; et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. **Stem Cells**, v. 28, n. 12, p. 2229–2238, 2010.

LAI, Y.; ADHIKARAKUNNATHU, S.; BHARDWAJ, K.; et al. LI37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. **Plos one**, v. 6, n. 10, 2011.

LEE, S. Y.; LEE, M.-S.; LEE, H. Y.; et al. F2L, a peptide derived from heme-binding protein, inhibits LL-37-induced cell proliferation and tube formation in human umbilical vein endothelial cells. **FEBS letters**, v. 582, n. 2, p. 273–8, 2008.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.

LOMBARDO, E.; DELAROSA, O. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: Implications on therapeutic potential. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

MACCARIO, R.; PODESTÀ, M.; MORETTA, A.; et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. **Haematologica/the hematology journal**, v. 90, n. 4, p. 516–525, 2005.

MAITRA, B.; SZEKELY, E.; GJINI, K.; et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. **Bone marrow transplantation**, v. 33, n. 6, p. 597–604, 2004.

MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell**

science, v. 119, n. Pt 11, p. 2204–13, 2006.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase – mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619–4622, 2004.

MOOKHERJEE, N.; LIPPERT, D. N. D.; HAMILL, P.; et al. Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes. **Journal of immunology**, v. 183, n. 4, p. 2688–96, 2009.

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

NIYONSABA, F.; IWABUCHI, K.; SOMEYA, A.; et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. **Immunology**, v. 106, n. 1, p. 20–26, 2002.

OMAR, R. EL; XIONG, Y.; DOSTERT, G.; et al. Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells. **Immunology and Cell Biology**. 2015.

PANEPUCCI, R. A.; SIUFI, J. L. C.; SILVA, W. A.; et al. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1263–1278, 2004.

PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; et al. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental cell research**, v. 314, n. 3, p. 603–15, 2008.

PEVSNER-FISCHER, M.; MORAD, V.; COHEN-SFADY, M.; et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1422–1432, 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

POLCHERT, D.; SOBINSKY, J.; DOUGLAS, G. W.; et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 1745–1755, 2008.

POTIAN, J. A.; AVIV, H.; PONZIO, N. M.; HARRISON, J. S.; RAMESHWAR, P. Veto-Like Activity of Mesenchymal Stem Cells: Functional Discrimination Between Cellular Responses to Alloantigens and Recall Antigens. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3426–3434, 2003.

POUND, L. D.; PATRICK, C.; EBERHARD, C. E.; et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. **Diabetes**, v. 64, n. 12, p. 4135–4147, 2015.

PREVOSTO, C.; ZANCOLLI, M.; CANEVALI, P.; et al. Stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica/the hematology journal**, v. 92, n. 07, p. 881–888, 2007.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental cell research**, v. 312, n. 12, p. 2169–79, 2006.

RINGDÉN, O.; UZUNEL, M.; RASMUSSEN, I.; et al. Mesenchymal Stem Cells

for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease. **Transplantation**, v. 81, n. 10, 2006.

RYAN, J. M.; BARRY, F.; MURPHY, J. M. Interferon- γ does not break , but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**, p. 353–363, 2007.

SALDANHA-ARAUJO, F.; FERREIRA, F. I. S.; PALMA, P. V; et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem Cell Research**, v. 7, n. 1, p. 66–74, 2011.

SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I.; et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Immunobiology**, v. 109, n. 1, p. 228–235, 2006.

SCOTT, M. G.; DAVIDSON, D. J.; GOLD, M. R.; BOWDISH, D.; HANCOCK, R. E. W. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **Journal of immunology**, v. 169, n. 7, p. 3883–3891, 2002.

SHAYKHIEV, R.; BEISSWENGER, C.; KÄNDLER, K.; et al. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 289, n. 5, p. L842–L848, 2005.

SHI, D.; LIAO, L.; ZHANG, B.; et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF- κ B signaling. **Experimental Hematology**, v. 39, n. 2, p. 214–224.e1, 2011.

SINGH, D.; QI, R.; JORDAN, J. L.; MATEO, L. S.; KAO, C. C. The human antimicrobial peptide LL-37, but not the mouse ortholog, mCRAMP, can stimulate signaling by poly(I:C) through a FPRL1-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 12, p. 8258–8268, 2013.

SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 14–16, 2013.

SØRENSEN, B. O.; ARNLJOTS, K.; COWLAND, J. B.; BAINTON, D. F.; BORREGAARD, N. The Human Antibacterial Cathelicidin, hCAP-18, Is Synthesized in Myelocytes and Metamyelocytes and Localized to Specific Granules in Neutrophils. **Blood**, v. 90, n. 7, p. 2796–2803, 1997.

SOUZA, V. F. DE; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. DE A.; RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. N. Células-tronco : uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol.**, v. 2, n. 2, p. 251–256, 2003.

TAMAMA, K.; KAWASAKI, H.; WELLS, A. Epidermal Growth Factor (EGF) treatment on Multipotential Stromal Cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

TOMCHUCK, S. L.; ZWEZDARYK, K. J.; COFFELT, S. B.; et al. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. **Stem Cells**, v. 26, p. 99–107, 2008.

TSE, W. T.; PENDLETON, J. D.; BEYER, W. M.; EGALKA, M. C.; GUINAN, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v. 75, n. 3, 2003.

VISWANATHAN, A.; PAINTER, R. G.; LANSON, N. A.; WANG, G. Functional Expression of N -Formyl Peptide Receptors in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 5, p. 1263–1269, 2007.

WATERMAN, R. S.; TOMCHUCK, S. L.; HENKLE, S. L.; BETANCOURT, A. M. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm : Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. **Plos one**, v. 5, n. 4, 2010.

WERNICKE, C. M.; GRUNEWALD, T. G. P.; HENDRIK, J.; et al. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. **International Archives of Medicine**, v. 4, n. 1, p. 27, 2011.

WILLIAMS, A. R.; HARE, J. M. Implications for Cardiac Disease. **Circulation Research**, v. 016960, p. 910–922, 2011.

YANG, S.-H.; PARK, M.-J.; YOON, I.-H.; et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. **Experimental & molecular medicine**, v. 41, n. 5, p. 315–24, 2009.

YOSHIOKA, M.; FUKUISHI, N.; KUBO, Y.; et al. Human cathelicidin CAP18/LL-37 changes mast cell function toward innate immunity. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 2, p. 212–216, 2008.

YU, J.; MOOKHERJEE, N.; WEE, K.; et al. Host Defense Peptide LL-37, in Synergy with Inflammatory Mediator IL-1 , Augments Immune Responses by Multiple Pathways. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7684–7691, 2007.

ZHANG, Z.; CHERRYHOLMES, G.; CHANG, F.; et al. Evidence that cathelicidin peptide LL-37 may act as a functional ligand for CXCR2 on human neutrophils. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 11, p. 3181–3194, 2009.