UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIANA DE MATOS MAÇONETTO

**Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas de células estromais
mesenquimais humanas usadas em terapia celular**

Ribeirão Preto

2020

JULIANA DE MATOS MAÇONETTO

**Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas de células estromais
mesenquimais humanas usadas em terapia celular**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Células-Tronco e
Terapia Celular

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Maçonetto, Juliana de Matos

Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais humanas usadas em terapia celular, 2020.

110 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Covas, Dimas Tadeu

1. Células estromais mesenquimais. 2. Vesículas extracelulares. 3. Imunomodulação. 4 Soro AB humano.

Nome: MAÇONETTO, Juliana de Matos

Título: Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais humanas usadas em terapia celular

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

Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Rosely e minha irmã Giovana,
Por estarem sempre comigo, apoiando e incentivando
em todas as minhas fases.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que por intercessão de Santa Rita de Cássia, sempre ilumina e abençoa o meu caminho.

À minha mãe Rosely, exemplo de força e coragem, por todo o amor e dedicação em minha criação, despertando e incentivando a sede pelo conhecimento e a importância deste em minha vida, e a minha irmã Giovana, que com muito carinho e apoio juntas não mediram esforços para que eu concluísse esta etapa.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pela orientação, oportunidade e viabilização de todos os experimentos realizados na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À Profa. Dra. Simone Kashima, por toda a contribuição para meu crescimento científico e intelectual.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular pela contribuição científica e acadêmica e todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Debora, Elaine, Evandra, Felipe, Fernanda, Ian, Jonathan, Josiane, Julianne, Larissa, Mariane, Pérciles, Slav, Yann e também a todos que já não estão mais no laboratório, mas participaram de etapas muito importantes nessa jornada, especialmente a Rafaela que se tornou uma irmã e me acolheu em sua família. Agradeço a todos pela amizade, companheirismo, incentivo, aprendizagem, ajuda com os experimentos e por todos os momentos de alegria e descontração.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Terapia Celular, Transferência Gênica e Citometria de Fluxo pela atenção e disponibilidade nas análises.

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano da Silveira do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP) pela realização das Análises de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) e pelas valiosas contribuições científicas.

A todos os funcionários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pela atenção e serviços prestados.

À Dalvinha, Carmen, Rosana e Silvia por toda ajuda com a parte burocrática e questões sobre o programa de pós-graduação.

Aos membros da banca pela disponibilização e contribuição para melhoria deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2018/04232-7. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

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

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MAÇONETTO, Juliana de Matos. **Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais humanas usadas em terapia celular.** 2020. 100 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As células estromais mesenquimais (MSC) são células heterogêneas com capacidade de controlar a resposta imunológica, atuando como uma ferramenta importante na terapia celular, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. Evidências sugerem que as vesículas extracelulares derivado de células estromais mesenquimais (EV-MSC) apresenta funções semelhantes às MSC, transportando moléculas bioativas para células-alvo, que podem alterar seu fenótipo ou comportamento funcional. O objetivo deste trabalho foi a caracterização morfológica e funcional das vesículas extracelulares derivadas das MSC (EV-MSC) de fontes distintas, cultivadas em meio livre de xenoantígenos, nas condições de hipóxia e normóxia. Para isso, foi padronizado um protocolo eficiente para depleção das vesículas extracelulares do soro AB humano utilizado na produção das EV-MSC, e avaliado o seu efeito sobre as características morfológicas, imunofenotípicas, proliferação, viabilidade e propriedades de diferenciação das MSC. Os resultados obtidos demonstraram que é possível isolar e caracterizar MSC do cordão umbilical (UC-MSC) e tecido adiposo (AT-MSC), em condições de normóxia e hipóxia, livres de xenoantígenos e empobrecido de EV, representando um grande avanço para a produção de EV-MSC. Em seguida, foram isoladas EV do sobrenadante de cultura das UC-MSC e AT-MSC por ultracentrifugação e caracterizadas quanto ao tamanho e concentração, bem como a expressão de proteínas. Também foi avaliado a expressão de genes envolvidos na imunorregulação presentes nas EV e o seu potencial de inibição e interação com os linfócitos T. Como conclusão, este trabalho demonstra que as EV derivadas de MSC apresentam um efeito imunomodulatório em condições livres de xenoantígenos e pré-condicionadas por hipóxia, com potencial aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais; Vesículas extracelulares; Imunomodulação; Soro AB humano.

ABSTRACT

MAÇONETTO, Juliana de Matos. **Functional analysis of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells used in cell therapy.** 2020. 100 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Mesenchymal stromal cells (MSC) are heterogeneous cells capable of controlling the immune response, acting as an important tool in cell therapy, especially in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. Evidence suggests that extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells (EV-MSC) has similar functions to MSC, transporting bioactive molecules to target cells, which can alter their phenotype or functional behavior. The objective of this work was the morphological and functional characterization of extracellular vesicles derived from MSC (EV-MSC) from different sources, cultured in a medium free of xenoantigens, under hypoxia and normoxia. For this purpose, an efficient protocol for depleting the extracellular vesicles of human AB serum was standardized and will be used in the production of EV-MSC. Then, the effect of depleted EV medium on the morphological, immunophenotypic, proliferation, viability and differentiation properties of MSC was evaluated. The results demonstrated that it is possible to isolate and characterize MSC from umbilical cord (UC-MSC) and adipose tissue (AT-MSC), in normoxic and hypoxic conditions, under conditions free of xenoantigens and depleted of EV, representing a major advance for production of EV-MSC. In addition, EV were isolated from the supernatant of the MSC by ultracentrifugation and characterized in terms of size and concentration, as well as protein expression. The expression of genes involved in immunoregulation present in EVs and their potential for inhibition and interaction with T lymphocytes was also evaluated. In conclusion, this work demonstrates that MSC-derived EVs have an immunomodulatory effect in conditions free of xenoantigens and pre-conditioned by hypoxia, with potential therapeutic application.

Keywords: Mesenchymal stromal cells; Extracellular vesicles; Immunomodulation; Human AB serum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células imunológicas influenciadas pelas células estromais mesenquimais.....	25
Figura 2 - Composição do exossomo	27
Figura 3 - Esquema de transferência de proteínas e RNA por EV	28
Figura 4 - Capacidade imunomoduladora das EV derivadas de MSC.....	31
Figura 5 - Delineamento experimental.....	37
Figura 6 - Fases do soro AB humano após ultracentrifugação.....	53
Figura 7 - Caracterização morfológica das UC-MSC.....	56
Figura 8 - Caracterização morfológica das AT-MSC	58
Figura 9 - Caracterização morfológica das BM-MSC	60
Figura 10 - Morfologia fibroblastoide das UC-MSC e AT-MSC por análise confocal.....	61
Figura 11 - Perfil imunofenotípico das MSC	63
Figura 12 - Capacidade de diferenciação adipogênica das UC-MSC.....	64
Figura 13 - Capacidade de diferenciação adipogênica das AT-MSC	66
Figura 14 - Comparação da diferenciação adipogênica das UC-MSC e AT-MSC....	68
Figura 15 - Comparação da diferenciação adipogênica das UC-MSC e AT-MSC entre o cultivo em normóxia e hipóxia	69
Figura 16 - Capacidade de diferenciação osteogênica das UC-MSC.....	70
Figura 17 - Capacidade de diferenciação osteogênica das AT-MSC	71
Figura 18 - Comparação da diferenciação osteogênica das UC-MSC e AT-MSC....	72
Figura 19 - Potencial proliferativo das MSC em normóxia e hipóxia	73
Figura 20 - Viabilidade das UC-MSC.....	75
Figura 21 - Viabilidade das AT-MSC	76
Figura 22 - Distribuição do tamanho das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais de duas fontes	77
Figura 23 - Distribuição da concentração das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais de duas fontes	78
Figura 24 - Nível de expressão de proteínas comumente detectadas em exossomos por Western Blotting.....	79
Figura 25 - Expressão de genes relacionados com a imunorregulação nas MSC e EV.....	80

Figura 26 - Análise da proliferação de células T utilizando UC-MSC e AT-MSC.....	82
Figura 27 - Análise da proliferação de células T utilizando EV-UC-MSC e EV-AT-MSC.....	84
Figura 28 - Análise da proliferação de células T utilizando EV-UC-MSC e EV-AT-MSC nas condições de normóxia e hipóxia	86
Figura 29 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de UC-MSC em normóxia.....	88
Figura 30 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de UC-MSC em hipóxia.....	89
Figura 31 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de AT-MSC em normóxia.....	90
Figura 32 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de AT-MSC em hipóxia.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração e tamanho das vesículas do soro AB humano	53
Tabela 2 - Perfil bioquímico do soro AB humano e das fases formadas após a ultracentrifugação.....	54
Tabela 3 - Dados dos doadores das amostras das células estromais mesenquimais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ACTB	beta-actina
Alix	do inglês, <i>ALG-2-interacting protein-x</i>
APC	do inglês, <i>allophycocyanin</i>
AT-MSC	células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo
BPM	boas práticas de manufaturas
BSA	soro albumina bovina
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
CD	do inglês, <i>cluster differentiation</i>
CD4+	linfócitos t <i>helper</i>
cDNA	DNA complementar
CFSE	do inglês, <i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CFU-F	do ingles, <i>colony forming unit fibroblast</i>
cm²	centímetros quadrados
CO₂	dióxido de carbono
COX	Cicloxigenases
DC	do inglês <i>dendritic cell</i>
DEPC	do inglês, <i>diethylpyrocarbonate</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EV	do inglês, <i>extracellular vesicles</i>
EV-AT-MSC	vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do tecido adiposo
EV-UC-MSC	vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do cordão umbilical
EV-MSC	vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais
G	Gramma
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GVHD	do inglês, <i>graft-versus-host disease</i>
HGF	do inglês, <i>hepatocyte growth factor</i>
HLA-DR	antígeno leucocitário de histocompatibilidade - classe II
HSC	do inglês, <i>hematopoietic stem cell</i>
IDO	do inglês, <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN-γ	interferon-gama
IL	Interleucina
ILV	vesículas intraluminais
ISCT	do inglês, <i>International Society for Cellular Therapy</i>
ISEV	do inglês, <i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
kDa	Quilodalton
L	Litro
LGAL	galectina-1
M-CSF	do inglês, <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MCU	células estromais mesenquimais derivadas do cordão umbilical
Mg	Miligrama
MHC	complexo de histocompatibilidade maior
mL	Mililitro
MO-MSC	células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
MSC	células mesenquimais estromais multipotentes
MVB	do inglês, <i>multivesicular body</i>
NaCl	cloreto de sódio
NK	células <i>natural killer</i>
Nm	Nanômetro
NTA	análise de rastreamento de nanopartículas
°C	grau centígrado
PAGE	do inglês, <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	do inglês, <i>phycoerythrin</i>
PerCP	do inglês, <i>peridinin chlorophyll protein complex</i>

PGE2	prostaglandina E2
PHA	do inglês, <i>phytohemagglutinin</i>
AB HS	Plasma AB humano convertido em soro
PVDF	do inglês, <i>polyvinylidene difluoride</i>
RNA	ácido ribonucleico
SCF	do inglês, <i>stem cell fator</i>
SDS	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	soro fetal bovino
TGF-β1	do inglês, <i>transforming growth factor-β1</i>
TNF-α	do inglês, <i>tumor necrosis factor alfa</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSG101	do inglês, <i>tumor susceptibility gene 101</i>
URE	unidade relativa de expressão
V	Volt
VEGF	do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
x g	força da gravidade
α-MEM	do inglês, <i>minimal essential medium-alpha</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Células estromais mesenquimais humanas.....	20
1.1.1 Diferentes fontes de células.....	21
1.1.2 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	22
1.1.3 Efeito imunomodulador e aplicações terapêuticas.....	24
1.2 Vesículas extracelulares	26
1.2.1 Vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais.....	30
1.3 Hipótese.....	32
1.4 Justificativa.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Estratégia experimental	37
3.2 Aspectos éticos.....	38
3.3 Produção do soro AB humano	38
3.4 Depleção de vesículas extracelulares do soro AB humano	38
3.5 Análise bioquímica.....	39
3.6 Dados das amostras biológicas	39
3.6.1 Medula óssea	39
3.6.2 Cordão umbilical	39
3.6.3 Tecido adiposo	40
3.7 Isolamento das células estromais mesenquimais	40
3.8 Cultivo e expansão estática das células mesenquimais	41
3.9 Caracterização <i>in vitro</i> das células estromais mesenquimais	42
3.9.1 Análise da morfologia	42
3.9.2 Análise do perfil imunofenotípico e viabilidade	42
3.9.3 Diferenciação em linhagens mesodérmicas <i>in vitro</i> : adipócitos e osteócitos.....	43
3.9.4 Avaliação da proliferação celular	43

3.10 Purificação das vesículas extracelulares do sobrenadante de cultura celular.....	44
3.11 Caracterização das vesículas extracelulares	44
3.11.1 Avaliação do tamanho e concentração	44
3.11.2 Perfil de proteínas.....	45
3.12 Análise do perfil de expressão gênica	46
3.12 Ensaio de proliferação de linfócitos T	48
3.13 Interação entre vesículas extracelulares e células-alvo	49
3.14 Análise dos dados.....	50
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Análise do tempo de ultracentrifugação para depleção do soro AB humano.....	52
4.2 Perfil bioquímico do soro AB humano depletado de vesículas extracelulares.....	54
4.3 Linhagens celulares	55
4.4 Morfologia.....	56
4.5 Perfil imunofenotípico	62
4.6 Capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica <i>in vitro</i>	64
4.7 Proliferação e viabilidade celular	73
4.8 Avaliação do tamanho e da concentração das vesículas extracelulares	76
4.9 Perfil de proteínas presentes nas vesículas extracelulares	78
4.10 Expressão de genes relacionados à imunomodulação presentes nas vesículas extracelulares	79
4.11 Potencial de imunomodulação das vesículas extracelulares	80
4.12 Interação das vesículas extracelulares com as células-alvo.....	84
5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÕES.....	103
7 REFERÊNCIAS.....	105

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células estromais mesenquimais humanas

As células estromais mesenquimais (MSC) são células heterogêneas multipotentes com capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens (PITTENGER et al., 1999). De acordo com os critérios mínimos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, do inglês *International Society for Cellular Therapy*), as MSC são caracterizadas por expressarem os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, enquanto não expressam CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. Além disso, as células mesenquimais exibem aderência ao plástico em condições de cultura padrão e são capazes de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (DOMINICI et al., 2006).

Essas células foram descritas pela primeira vez na década de 1970 por Friedenstein e colaboradores como sendo células-tronco não hematopoiéticas da medula óssea que formavam colônias de células alongadas aderidas ao plástico, assemelhando-se a fibroblastos, após cultivo em baixa densidade. Essas colônias foram nomeadas unidades formadoras de colônia fibroblastoide (CFU-F, do inglês *colony forming unit fibroblast*) (FRIEDENSTEIN et al., 1970). Posteriormente, essas células foram nomeadas como célula-tronco mesenquimal (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*) por Arnold Caplan e colaboradores, baseando-se na premissa de que estas células seriam progenitoras únicas de todos os tecidos conjuntivos de origem mesodérmica (CAPLAN et al., 1991).

No entanto, uma nova nomenclatura foi proposta para se referir à população de células aderentes ao plástico, de morfologia fibroblastóide e com capacidade de diferenciação multipotente *in vitro*, isoladas da medula óssea e outro tecidos, definida como células estromais mesenquimais multipotentes, pois o termo células-tronco mesenquimais deveria ser restrito às células-tronco com capacidade de autorrenovação, proliferação indefinida, plasticidade e caracterizadas rigorosamente *in vivo*, mas a sigla MSC foi mantida para ambas as situações (HORWITZ et al., 2005).

1.1.1 Diferentes fontes de células

As MSC humanas podem ser encontradas em vários tecidos e estão localizadas principalmente no nicho perivascular (CRISAN, M. *et al.*, 2008), onde desempenham um papel importante na homeostase, vigilância, reparo e remodelação de tecidos (LE BLANC; MOUGIAKAKOS, 2012. SHI, Y. *et al.*, 2012), sendo a principal fonte destas células mesenquimais a medula óssea (BM-MS), designadas como padrão ouro. No entanto, as BM-MS possuem limitações como a baixa frequência, estimada em 0,001% a 0,01% (PITTENGER *et al.*, 1999), associada ao método de coleta invasivo e doloroso, além de apresentarem diminuição do número e do potencial de diferenciação com o aumento da idade do doador.

Inúmeras fontes de MSC têm sido avaliadas com propósito de uso clínico e demonstraram ser vantajosas em relação a medula óssea. Já foram isoladas células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), sangue de cordão umbilical e placentário (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000), endotélio e subendotélio da veia umbilical (COVAS *et al.*, 2003), polpa dentária (POLTAVTSEVA *et al.*, 2014), dentre outros, que mostraram potencial promissor para proliferação e diferenciação em diferentes tipos celulares.

Uma fonte promissora de células mesenquimais adultas é o tecido adiposo (AT-MS). Zuk e colaboradores foram os primeiros a reportar uma população de células do lipoaspirado humano com diversas características *in vitro* similares as células mesenquimais da medula óssea, como aderência ao plástico, morfologia fibroblástica e capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos (ZUK *et al.*, 2001). A facilidade de obtenção das AT-MS é uma característica importante, pois essas células podem ser obtidas a partir de amostras de lipoaspirados do tecido adiposo subcutâneo por procedimentos minimamente invasivos ou de amostras que seriam descartadas após as cirurgias de lipoaspiração ou abdominoplastia. A quantidade de células obtidas, assim como em outros tecidos, pode variar de acordo com a idade, sexo, localização anatômica e tipo de tecido (tecido adiposo branco ou marrom) (BOURIN *et al.*, 2013).

Além dos tecidos adultos distintos (tecido adiposo, medula óssea, sangue periférico), as MSC podem ser obtidas de vários tecidos associados ao nascimento, incluindo placenta, cordão umbilical e sangue do cordão umbilical. As MSC isoladas

dos anexos fetais são atraentes para uso clínico devido à sua facilidade de isolamento, falta de restrições éticas e recuperação não invasiva (FORRAZ; MCGUCKIN, 2011).

Ao contrário do sangue do cordão, o cordão umbilical é considerado lixo hospitalar e geralmente descartado após o nascimento. Quando comparadas as BM-MSc, as células mesenquimais do cordão umbilical possuem maior potencial clonogênico e de expansão em cultura, além de menor tempo necessário à duplicação celular, o que pode ser explicado pela sua relativa natureza imatura (BAKSH; YAO; TUAN, 2007). Além de apresentarem reduzido risco de rejeição imunológica (HASS et al., 2011) e capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T, de modo dose dependente, em intensidade similar às BM-MSc (ENNIS et al., 2008).

Neste trabalho, foram utilizadas células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AT-MSc) e do cordão umbilical (UC-MSc) como fontes alternativas à medula óssea, por representem fontes de fácil acesso, com baixo risco aos doadores, abundância relativa de tecido e isolamento de um número elevado de células, apresentando maior potencial proliferativo e maior plasticidade.

1.1.2 Condições de cultivo *in vitro*

As propriedades das MSc são influenciadas por fatores biológicos, bioquímicos e biofísicos, *in vivo* e *in vitro*, que podem alterar suas funções, diferenciação, sobrevivência e potencial terapêutico (NAVA et al., 2012). Nesse contexto, é importante desenvolver métodos de cultura *in vitro* que mimetizem o nicho natural das MSc, permitindo a expansão celular para uso clínico.

As condições de cultura padrão das MSc utilizam uma tensão de oxigênio atmosférico de 21%, enquanto *in vivo*, essas células sobrevivem em um nicho onde as tensões de oxigênio geralmente ficam abaixo de 10% (DOS SANTOS et al., 2010). A expansão das MSc em ambientes com altos níveis de oxigênio podem levar ao estresse celular, senescência precoce, extensão do tempo de duplicação da população e danos ao DNA (HAQUE et al., 2013). Vários estudos já demonstraram que as MSc cultivadas em condição de hipóxia aumentam a proliferação, potencial angiogênico e regenerativo (SAPAROV et al., 2016. HU; LI, 2018).

Além disso, essas células são geralmente cultivadas com suplementos de origem animal, como altos níveis de soro fetal bovino (SFB), uma vez que este possui em sua composição fatores de crescimento, citocinas e hormônios que auxiliam no

crescimento celular, além da disponibilização de fatores essenciais à aderência das células na cultura (JOCHEMS *et al.*, 2002).

A utilização de SFB apresenta algumas desvantagens como elevada variabilidade lote a lote, risco de contaminação com vírus, príons, endotoxinas, bactérias e outros patógenos, introduz no meio de cultura altas concentrações de proteínas que podem ser imunogênicas e causar reações anafiláticas, principalmente se várias infusões forem necessárias, podendo ter como consequência a rejeição das células transplantadas (BIEBACK *et al.*, 2009). Esses fatores comprometem a utilização das MSC para fins terapêuticos. Outra grande desvantagem envolve aspectos éticos relacionados ao método desumano da coleta de sangue dos fetos (TEKKATTE *et al.*, 2011).

Em 1997 a Organização Mundial da Saúde publicou um memorando recomendando, quando possível, não utilizar produtos de origem animal na produção de insumos que possam ser utilizados em humanos (*World Health Organization*, WHO, 1997). Atualmente, as MSC são consideradas *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP) pela *European Medicine Agency* (EMA) e devem ser manipuladas e manufaturadas de acordo com as normas exigidas pelas agências regulatórias (TORRE *et al.*, 2015). Portanto, quando o objetivo é a utilização das MSC em aplicações clínicas é importante eliminar os componentes derivados de animais, substituindo por meios definidos, livres de soro e xenoantígenos para o isolamento e a expansão *in vitro*.

Diversos estudos têm buscado fontes proteicas de origem humana como substituto do SFB quando o objetivo é a utilização das MSC em aplicações clínicas. Uma alternativa para essa substituição é o soro AB humano (AB HS) (CÁNOVAS *et al.*, 2012), devido a sua disponibilidade e possibilidade de uso alogênico. Estudos do grupo de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto mostraram que o meio de cultura suplementado com 10% de soro AB HS foi capaz de suportar o crescimento das MSC quando comparado com o controle (10% de SFB), mantendo o perfil imunofenotípico, citogenético e as características funcionais. Além disso, a produção do soro AB humano apresentou reprodutibilidade lote a lote e os parâmetros de qualidade necessários para aplicação na terapia celular (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Neste trabalho, as células MSC foram expostas a um sistema de cultura semelhante ao *in vivo*, utilizando 5% de O₂ e meio de cultura suplementado com soro AB humano, para modelar um microambiente clinicamente mais relevante.

1.1.3 Efeito imunomodulador e aplicações terapêuticas

As MSC têm sido amplamente exploradas para o tratamento de doenças autoimunes, inflamatórias e degenerativas, devido ao seu fácil isolamento e cultivo, rápida expansão *in vitro*, potencial de diferenciação, imunossupressão e baixa diferenciação espontânea durante a expansão *ex vivo* (PAREKKADAN; MILWID, 2010. NAJAR *et al.*, 2016). A capacidade das MSC de controlar respostas imunológicas tem sido uma das abordagens mais atrativas e relevantes na terapia celular (YAMOUT *et al.*, 2010). Essa atividade de supressão depende do contato célula-célula e da expressão de alguns fatores solúveis, e não está relacionada ao reconhecimento do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), pois as MSC expressam baixos níveis de MHC classe I na superfície celular (LE BLANC *et al.*, 2003. NAJAR *et al.*, 2016). No entanto, as MSC podem alterar sua função imunossupressora de acordo com a situação patológica ou estado clínico do paciente, se tornando um desafio para a medicina (KRAMPERA *et al.*, 2006).

O efeito parácrino das MSC dependem do seu secretoma, incluindo a liberação de diversas moléculas que são capazes de suprimir ou modular as respostas imunes, como o *stem cell factor* (SCF), interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-10, IL-12, interferon-gama (IFN- γ), prostaglandina E2 (PGE2), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), galectina-1, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), *hepatocyte growth factor* (HGF) e *transforming growth factor*- β 1 (TGF- β 1).

Figura 1 - Células imunológicas influenciadas pelas células estromais mesenquimais

As células estromais mesenquimais (MSC) exercem efeito sobre uma gama de células envolvidas na resposta imune, influenciando diretamente as células CD4+, CD8+, células T-reg, neutrófilos e monócitos, e influenciam indiretamente células natural killer (NK) por meio de sua ação sobre as células dendríticas. Fonte: Adaptado de OWEN; NEWSOME, 2015.

Dentre os fatores fundamentais para os efeitos imunossupressores que são constitutivamente produzidos pela MSC está a PGE₂, enzima sintetizada por cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), relacionada com a redução na secreção de IL-2, IFN-γ e indução dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), levando à inibição da proliferação dos linfócitos T (SAKATA et al., 2010). Outra importante molécula é a galectina-1, a qual inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IFN-γ e TNF-α e a proliferação de células T (GIESEKE et al., 2010). Já a enzima IDO não é constitutivamente expressa pela MSC, mas após o estímulo de citocinas inflamatórias, como IFN-γ, a transcrição de IDO é aumentada significativamente. Essa enzima catalisa a degradação de triptofano, um aminoácido essencial para proliferação dos linfócitos, e induz o efeito imunossupressor em linfócitos T (LE BLANC; MOUGIAKAKOS, 2012).

Estas células possuem outras características importantes, como a formação do estroma de sustentação da hematopoese e o processo de enxertia das células-tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cell*). Além de secretar fatores

tróficos os quais modulam a inflamação, o remodelamento tecidual e a apoptose (BIEBACK *et al.*, 2011).

A propriedade das MSC em contribuir na formação e funcionamento do microambiente estromal tem sido explorada como uma abordagem terapêutica atrativa no transplante de HSC. A infusão de MSC pode minimizar a toxicidade do regime de condicionamento, facilitar a enxertia das células hematopoiéticas e diminuir a incidência e a severidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD, do inglês *graft-versus-host disease*) (LE BLANC *et al.*, 2004).

O Centro de Terapia Celular (CTC – Hemocentro-RP) no eixo da pesquisa clínica utiliza as MSC para o tratamento de pacientes GVHD corticorretratário. São disponibilizadas aos centros transplantadores conveniados bolsas contendo células mesenquimais derivadas do cordão umbilical criopreservadas para infusão nesses pacientes. Todas essas bolsas são produzidas no Laboratório de Terapia Celular de acordo com as normas de Boas Práticas de Manufaturas (BPM) e com controle de qualidade aprovado.

A GvHD aguda é uma complicação potencialmente fatal no transplante de células-tronco hematopoiéticas, que consiste no ataque dos tecidos hospedeiros por células imunocompetentes derivadas do doador, com participação de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alfa*) e interleucina-1 (IL-1), que contribuem para o dano tecidual do hospedeiro, podendo afetar muitos órgãos, como a pele, intestino, fígado e pulmão. O tratamento consiste na administração de corticosteroides, porém 25-30% dos pacientes apresentam uma refratariedade a esta classe de fármacos, conferindo um mau prognóstico com taxa de sobrevivência de aproximadamente 2 anos (FERRARA *et al.*, 2009). A infusão de MSC tem sido considerada como uma alternativa para pacientes GvHD corticorretratário.

1.2 Vesículas extracelulares

Estudos recentes demonstraram que o efeito imunomodulador das MSC também pode ser mediado por vesículas extracelulares (EV, do inglês *extracellular vesicles*), que realizam o transporte de moléculas bioativas para células-alvo podendo alterar seu fenótipo ou comportamento funcional (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). As vesículas extracelulares são estruturas limitadas por uma bicamada lipídica, semelhante à

membrana celular, liberadas por diferentes tipos de células e são altamente conservadas em procariotos e eucariotos (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). De acordo com o tamanho e o mecanismo de biogênese podem ser classificadas como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos.

Os exossomos são vesículas que variam entre 40 a 150 nm, possuem origem endocítica e são secretados a partir da fusão de corpos multivesiculares (MVB, do inglês *multivesicular body*) com a membrana plasmática. Já as microvesículas podem variar de 100 a 1000 nm sendo formadas diretamente do brotamento da membrana plasmática. E os corpos apoptóticos são vesículas de 50 a 500 nm liberadas durante a morte celular programada (GANGODA *et al.*, 2014).

Figura 2 - Composição do exossomo

Os exossomos são partículas limitadas por uma bicamada lipídica e formato esférico contendo vários tipos de proteínas, lipídios, DNA, RNA não codificantes, miRNA e mRNA importantes para o tráfego e comunicação intercelular, como a troca de informações genéticas e reprogramação das células receptoras. Fonte: Adaptado de Novus Biologicals, 2016.

As EV desempenham papéis em vários aspectos fisiológicos da biologia como: tráfego e comunicação intercelular, função no sistema imune, microbiologia, neurobiologia e contribuem para diversas doenças, como câncer e infecções virais. Além de seu potencial terapêutico, as EV são fontes de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de diversas patologias (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

A interação celular através das vesículas extracelulares serve como um mecanismo de tráfego intercelular de complexas mensagens biológicas, como a troca de moléculas que não pode ser realizada através de vias secretoras clássicas, ou que são predispostas a degradação extracelular (D'ASTI *et al.*, 2012). Essas vesículas reconhecem as células-alvo devido à presença de receptores específicos presentes na superfície da célula ou da EV (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). As EV podem transportar diversas moléculas bioativas como lipídios, proteínas, DNA, mRNA, miRNA, microRNA e metabólitos que refletem a condição e o tipo celular de origem (Raposo G.; Stoorvogel W., 2013).

Figura 3 - Esquema de transferência de proteínas e RNA por EV

As proteínas associadas à membrana (triângulos), proteínas transmembrana (retângulo) e os RNA (símbolos curvos) são seletivamente incorporados pelos corpos multivesiculares (MVB, do inglês multivesicular body) ou nas microvesículas (MV) que são liberadas a partir da membrana plasmática. As MVB se fundem com a membrana plasmática para a liberação dos exossomos no meio extracelular. MV e exossomos podem ligar-se na membrana plasmática de uma célula-alvo (1). As vesículas ligadas fundem-se diretamente com a membrana plasmática (2) ou são endocitadas (3). As vesículas endocitadas então liberam o seu conteúdo na célula receptora (4). Ambas as vias resultam na liberação de proteínas e RNA na membrana ou no citoplasma da célula alvo. A fusão e a endocitose foram representadas apenas pelos exossomos, mas as MV podem ter destinos semelhantes. Fonte: Adaptado de Raposo G.; Stoorvogel W., 2013.

A maioria das células liberam continuamente vesículas e fatores solúveis para o meio celular, portanto, o meio de cultura é uma excelente fonte para isolamento de EV (LÖTVALL *et al.*, 2014). Estudos indicam que o conteúdo, tamanho e composição

da membrana das EV são altamente heterogêneos, dinâmicos e dependem da fonte celular, estado e condições ambientais (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Um grande desafio no estudo das EV é melhorar e padronizar métodos para isolamento e análise. São utilizados para o isolamento diversas técnicas como precipitação polimérica, centrifugação diferencial, seguida de ultracentrifugação em gradiente de densidade utilizando sacarose e imunoafinidade, usando *beads* revestidas de anticorpo específico para EV. No entanto, diferentes métodos de purificação podem ser necessários para um isolamento eficaz. (THÉRY *et al.*, 2006; LÖTVALL *et al.*, 2014).

Atualmente, o método mais utilizado é a ultracentrifugação, que permite a separação de pequenas vesículas extracelulares a elevada velocidade, entre 100.000 a 200.000 x g. No entanto, o *pellet* pode conter agregados proteicos e outros contaminantes, portanto, torna-se necessário etapas iniciais de centrifugação diferencial de 300 x g, 2.000 x g e 10.000 x g para remoção de células, células mortas e debris celulares. Quando o objetivo é isolar pequenas vesículas extracelulares alguns protocolos indicam a filtração da amostra usando membrana de poro de 0,2 µm (THÉRY *et al.*, 2006). Outros fatores também podem influenciar a qualidade do isolamento como a habilidade do operador, tempo de rotação e tipos de rotores utilizados (WITWER *et al.*, 2013). Devido ao crescente interesse em EV e seu potencial uso em terapias ou como biomarcadores de doenças, vários kits estão sendo desenvolvidos e comercializados permitindo um procedimento mais fácil e preciso para o seu isolamento.

A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, do inglês *International Society for Extracellular Vesicles*) preconizou requisitos experimentais mínimos para a caracterização das EV, como a identificação do tamanho, a presença ou ausências de alguns tipos de proteínas, bem como a avaliação da morfologia (LÖTVALL *et al.*, 2014). Como regra geral, pelo menos duas técnicas devem ser usadas para caracterizar as EV.

Para a identificação do tamanho pode ser utilizado a técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) que permite análise apenas do tamanho das EV, ou a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês *nanoparticle tracking analysis*) que permite a análise da concentração (partículas/mL) e distribuição de tamanho (faixa de nm) das EV. Para a identificação de proteínas é recomendado a utilização de técnicas como *Western Blotting*, citometria de fluxo ou

espectrometria de massas. A partir dessas técnicas, é demonstrado a presença de proteínas transmembrana, como as tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81), proteínas citosólicas, como TSG101, HSP70 e Alix, além da ausência de proteínas intracelulares, como provenientes da mitocôndria (citocromo c = CYC1). Para analisar a morfologia das EV são indicadas a microscopia eletrônica de transmissão ou microscopia de força atômica (LÖTVALL *et al.*, 2014).

1.2.1 Vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais

As vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais (EV-MSC) podem mimetizar as atividades biológicas das MSC, e assim serem utilizadas como uma alternativa para a terapia celular (BAGNO *et al.*, 2018). As vantagens no uso clínico das EV-MSC estão relacionadas com o seu perfil de segurança elevado, apresentando menor imunogenicidade e incapacidade de formar tumores diretamente (LIEW *et al.*, 2017), além do seu potencial de migrar com eficiência para o órgão-alvo após a infusão, sem ficarem retidas na microvasculatura pulmonar, como ocorre com as células (BÖRGER *et al.*, 2017).

Semelhante as vesículas extracelulares derivadas de outros tipos celulares, as EV-MSC participam da comunicação intercelular e carregam proteínas, mRNA e microRNA (miRNA) para as células-alvo (HELDING *et al.*, 2015). Estudos anteriores indicam que o fenótipo e a função dessas EV-MSC podem variar dependendo da fonte de MSC (BÖRGER *et al.*, 2017).

A terapia com vesículas extracelulares derivadas de MSC está emergindo como uma estratégia promissora para o tratamento de várias doenças, em particular aquelas com componente inflamatório. As EV-MSC têm demonstrado mediar os efeitos imunossupressores das MSC, estimulando a polarização dos macrófagos M2 e a indução de células Treg (ZHANG *et al.*, 2014). Além de suprimir a proliferação de linfócitos T, B, células dendríticas e NK em co-cultura com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) *in vitro* (BURRELLO *et al.*, 2016). Deste modo, as EV-MSC podem representar uma solução para algumas limitações das terapias baseadas em células, como a senescência induzida pela cultura, instabilidade genética, perda de propriedades funcionais, dentre outras (NAWAZ *et al.*, 2016).

Figura 4 - Capacidade imunomoduladora das EV derivadas de MSC

As vesículas extracelulares (EV) derivadas de células estromais mesenquimais (MSC) podem induzir efeitos dependendo da célula-alvo, mimetizando a capacidade imunomoduladora das MSC. DC: células dendríticas; NK: células natural killer. Fonte: Adaptado de YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015.

As EV-MSC demonstraram em estudos pré-clínicos serem seguras e escaláveis para doses clinicamente relevantes. Por exemplo, grupos de pesquisas confirmaram que as EV-MSC exibem atividade cardio e renal-protetora e foram eficazes em modelos de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar, dentre outros (PHINNEY; PITTENGER, 2017). Essas vesículas também promoveram a reepitelização de feridas cutâneas, induzindo a proliferação de células endoteliais e a angiogênese (RANI *et al.*, 2015).

No entanto, o uso clínico de EV-MSC é considerado limitado pelo fato de que a tradução de terapias baseadas em vesículas extracelulares dos estudos pré-clínicos para a clínica requer a resolução de parâmetros críticos. Entre as principais questões a serem abordadas estão o estabelecimento das condições ideais de cultura de MSC e protocolos para a produção, isolamento e armazenamento das EV que fornecem uniformidade entre os lotes, dose ideal, cronograma de administração e o desenvolvimento de ensaios de potência, que permitem a avaliação da eficácia (BÖRGER *et al.*, 2017).

1.3 Hipótese

As vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais apresentam diferenças no seu potencial imunossupressor de acordo com as fontes e condições de cultura.

1.4 Justificativa

Desde 2001, o Hemocentro de Ribeirão Preto abriga o Centro de Terapia Celular (CTC/FAPESP) que realiza pesquisas básicas e aplicadas sobre as MSC. Em 2007 tiveram início as atividades do Laboratório de Terapia Celular, desde então, já foram fornecidas doses de MSC da medula óssea para pacientes com diversas condições clínicas, como anemia aplástica, GvHD e diabetes mellitus. Atualmente, são disponibilizadas MSC do cordão umbilical (MCU) para o tratamento dos pacientes GvHD corticorrefratária, uma vez que estas células são capazes de modular a resposta imunológica em doenças inflamatórias e autoimunes, além de oferecerem vantagens como a facilidade de acesso e coleta, sem conflitos éticos. Além disso, o grupo de pesquisa validou a substituição do SFB por soro AB humano para expansão destas células, com o intuito de eliminar o risco de contaminação por xenoantígenos.

O que torna as EV alvo de estudos para futuras aplicações clínicas é o seu importante papel no efeito parácrino das MSC e em diversas propriedades como a imunomodulação e transporte de moléculas bioativas para células-alvo podendo alterar seu fenótipo ou comportamento funcional. Assim, este projeto propõe a caracterização morfológica e funcional das vesículas extracelulares derivadas das MSC. Para tanto, é necessário desenvolver um padrão de isolamento e caracterização das EV-MSC, bem como avaliar o seu efeito imunomodulatório em condições livres de xenoantígenos e em tensões de oxigênio semelhantes ao *in vivo*. Além disso, analisar os mecanismos de ação das EV, que poderá determinar o seu potencial terapêutico, auxiliando a melhora no tratamento dos pacientes com doenças inflamatórias e autoimunes, como o GVHD corticorrefratária, diminuindo os efeitos secundários do tratamento e superando as limitações do uso das células.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características morfológicas e funcionais das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais humanas de diferentes fontes, cultivadas em meio de cultura suplementado com soro AB humano nas condições de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂).

2.2 Objetivos específicos

Parte I: Padronização do protocolo para produção do meio de cultura depletado de vesículas extracelulares.

- Produzir o soro AB humano.
- Analisar o tempo de depleção das vesículas extracelulares presentes no soro AB humano.
- Avaliar a qualidade do soro produzido quanto a composição bioquímica.

Parte II: Isolamento e caracterização *in vitro* das células estromais mesenquimais.

- Isolar as células estromais mesenquimais da medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo.
- Expandir as células isoladas nas condições de hipóxia e normóxia.
- Caracterizar *in vitro* as células mesenquimais em relação a morfologia, capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, perfil imunofenotípico, proliferação e viabilidade.
- Comparar o efeito da suplementação com soro AB humano depletado no cultivo das células mesenquimais em relação ao soro AB humano sem depleção (controle).

Parte III: Purificação e caracterização das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais.

- Isolar as vesículas extracelulares do sobrenadante de cultura das células mesenquimais das diferentes fontes, nas condições de hipóxia e normóxia.
- Caracterizar as vesículas extracelulares derivadas das células mesenquimais quanto ao tamanho, concentração e marcadores proteicos específicos.
- Comparar as características das vesículas extracelulares obtidas do cultivo na condição de hipóxia em relação a normóxia.

Parte IV: Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais.

- Avaliar a expressão de genes relacionados a imunomodulação nas vesículas extracelulares.
- Isolar células mononucleares do sangue periférico para co-cultivo com as vesículas extracelulares.
- Analisar a interação entre as vesículas extracelulares e os linfócitos T.
- Avaliar o potencial de inibição da proliferação de linfócitos T promovido pelas vesículas extracelulares cultivadas em hipóxia e normóxia.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental

Esse trabalho foi dividido em quatro etapas, como demonstrado no delineamento experimental (**Figura 5**). A primeira etapa refere-se à padronização de um protocolo eficiente para depleção das vesículas extracelulares do soro AB humano, visando a produção de EV-MS. Na segunda etapa, foi realizado o isolamento e caracterização *in vitro* das células estromais mesenquimais de diferentes fontes humanas, nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂).

Durante a terceira etapa, foi realizado o isolamento e caracterização das vesículas extracelulares do sobrenadante de cultura das MSC quanto ao tamanho, concentração e presença ou ausência de alguns tipos de proteínas. A quarta etapa trata-se da análise funcional das vesículas extracelulares, em que foi realizada a expressão gênica, avaliação do potencial de imunorregulação das EV derivadas das MSC e sua capacidade de interação com as células-alvo.

Figura 5 - Delineamento experimental

As MSC foram isoladas e cultivadas em meio contendo soro AB humano normal e depletado de EV, sob condição de normóxia (21%O₂) e hipóxia (5%O₂), e avaliadas quanto as características morfológicas, imunofenotípicas, proliferação e propriedades de diferenciação. As vesículas extracelulares foram isoladas do sobrenadante da cultura das MSC, e caracterizadas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e análise de expressão de proteínas. Em seguida, foi avaliado o potencial de imunorregulação das EV em linfócitos T, a interação entre EV e as células-alvo e expressão gênica. Fonte: Próprio autor.

3.2 Aspectos éticos

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), registrado sob o número de processo: 297/2018.003-02. Além de aprovado pela Comissão Deliberativa em Viabilização para Cessão de Amostras Biológicas e/ou Hemocomponentes para fins de Pesquisa Científica processo nº 07/2018 e o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, de acordo com o processo HCRP nº 11849/2018.

Parte I: Padronização do protocolo para produção do meio de cultura depletado de vesículas extracelulares.

3.3 Produção do soro AB humano

O soro AB humano (AB HS) foi produzido de acordo com o protocolo estabelecido por Pytlik *et al.* (2009) com modificações de Santos VTM *et al.* (2016). Para cada lote, seis unidades de plasma humano AB positivo foram descongelados à temperatura ambiente e transferidos para uma bolsa plástica estéril, com capacidade de dois litros, com auxílio de dois equipos para administração de soluções intravenosa, previamente conectados entre si. Ao pool de plasma humano foi adicionado gliconato de cálcio (100 mg/mL) e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por três horas. Em seguida, a bolsa foi incubada por 48 horas à 4°C. Após esse período, foi realizada a esterilização e remoção dos coágulos de fibrina por filtração (0,2 µm). O soro AB produzido foi alíquotado em tubos de 50mL e estocados à -20°C até o momento do uso.

3.4 Depleção de vesículas extracelulares do soro AB humano

Para a análise das EV-MSC, foi utilizado meio de cultura livre de vesículas extracelulares provenientes de outras fontes. Para isso, alíquotas do soro AB foram centrifugadas a 100.000 x g (rotor SW 28 - *Beckman*®) durante 18 horas a 4°C, seguido de filtração (0,22 µm).

O meio α -MEM (*Gibco-BRL*) foi suplementado com 10% de soro AB humano depletado de EV, concentração requerida para o cultivo de todas as linhagens de células estromais mesenquimais.

3.5 Análise bioquímica

A análise bioquímica foi realizada pelo Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Para avaliar a qualidade do soro AB humano depletado em relação ao soro controle, foram obtidas as dosagens de proteína total, sódio, potássio, ferro, fosfatase alcalina, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), cloreto, glicose, gama GT, ácido úrico, ureia, colesterol, triglicérides e cálcio.

Parte II: Isolamento e caracterização *in vitro* das células estromais mesenquimais

3.6 Dados das amostras biológicas

3.6.1 Medula óssea

A coleta de medula óssea humana foi realizada em voluntários saudáveis (n=3), recrutados dentre os doadores de medula óssea para transplante alogênico da **Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**. Como critério de inclusão foram considerados indivíduos com idade superior a 18 anos e inferior a 50 anos, ausência de alterações genéticas e sorologia negativa para HIV, HBsAg, HCV ou HTLV. As amostras foram obtidas por meio de uma única punção e aspirado da crista ilíaca, coletadas em tubos com anticoagulante e processadas logo após a extração.

3.6.2 Cordão umbilical

As amostras de cordão umbilical (n=3) foram obtidas a partir de recém-nascidos a termo (>37 semanas de gestação), saudáveis, nascidos por parto cesárea, no **Centro**

de Referência à Saúde da Mulher – Mater. Os critérios de exclusão das amostras foram: recém-nascidos por parto normal, gestantes cuja bolsa de líquido amniótico rompeu-se há mais de 18 horas antes do parto, gestantes cuja temperatura corporal for maior que 38°C durante o parto e gestantes com sorologia positiva para HIV, HBsAg, HCV ou HTLV durante o pré-natal.

No centro obstétrico, após a secção do cordão pelo obstetra, a coleta de amostra de um fragmento de 8 cm de cordão umbilical foi feita dos anexos fetais destinados ao descarte. O procedimento foi realizado por um enfermeiro sob condições de antisepsia. A realização do procedimento de coleta desta forma garante a não intervenção no parto e a segurança do recém-nascido.

3.6.3 Tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo (n=3) são de remanescentes de lipoaspiração de abdômen de pacientes saudáveis da **Clínica Zampar de Ribeirão Preto** em colaboração com o Dr. Antônio Gustavo Zampar. Os critérios de inclusão foram indivíduos sem alterações genéticas, com boa saúde e sorologia negativa para HIV, HBsAg, HCV ou HTLV. Não houve restrição quanto ao sexo e idade. Foram coletados cerca de 10 mL de gordura em frascos estéreis, esse procedimento foi realizado pelo médico cirurgião plástico sob condições de antisepsia.

3.7 Isolamento das células estromais mesenquimais

Para o isolamento de UC-MSC, um fragmento de cordão foi digerido enzimaticamente com solução 0,5% colagenase I (*Sigma-Aldrich*). As células resultantes do tratamento foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² (*Greiner Bio-One*) e cultivadas em meio de cultura α -MEM (*Gibco-BRL*) suplementado com 20% AB HS, 200 mM/mL de L-glutamina (*Gibco-BRL*), 100 U/mL penicilina (*Gibco-BRL*), 100 μ g/mL de estreptomicina (*Gibco-BRL*), 2,4 g/L de Hepes (*Sigma-Aldrich*) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (*Merck*).

Para o isolamento de BM-MSC, cada amostra de medula óssea foi diluída em solução tampão fosfato-salino (PBS - Phosphate Buffer Saline) na concentração 1:2 (v: v), e lentamente adicionada em um tubo cônico contendo 13 mL de Ficoll (*GE Healthcare*), de maneira que as duas fases se mantiveram separadas. A solução foi

centrifugada a 450 x g por 30 minutos à temperatura ambiente com parada lenta, e o produto resultante foi uma solução com quatro fases sedimentadas de acordo com a densidade de cada componente da amostra. A camada contendo o concentrado das células mononucleadas foi retirada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionadas 40 mL de tampão PBS seguido de centrifugação a 450 x g por 10 minutos, essa etapa foi repetida 2 vezes. Por fim, o sedimento celular foi ressuspensão em meio de cultura α -MEM (Gibco-BRL) suplementado com 20% AB HS, 200 mM/mL de L-glutamina (Gibco-BRL), 100 U/mL penicilina (Gibco-BRL), 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco-BRL), 2,4 g/L de Hepes (Sigma-Aldrich) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (Merck), e plaqueado para o cultivo.

Para o isolamento de AT-MSC, 10 mL da amostra de tecido adiposo lipoaspirado foi adicionado em 10 mL de tampão de coleta contendo: PBS, Albumina, Penicilina, Glicose. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de collagenase IA (Sigma-Aldrich) e incubado por 60 minutos em banho maria à 37°C, agitando a cada 10 minutos. Para inativar a ação da enzima foi adicionado 30 mL de RPMI suplementado com 5% de AB HS. O tubo foi centrifugado a 450 x g por 10 minutos a 22°C e sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de pipeta sorológica. O pellet foi ressuspensão em 50 mL de PBS e novamente centrifugado a 450 x g por 10 minutos a 22°C. Para finalizar, o sedimento celular foi ressuspensão em meio de cultura α -MEM (Gibco-BRL) suplementado com 20% AB HS, 200 mM/mL de L-glutamina (Gibco-BRL), 100 U/mL penicilina (Gibco-BRL), 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco-BRL), 2,4 g/L de Hepes (Sigma-Aldrich) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (Merck), e plaqueado para o cultivo.

3.8 Cultivo e expansão estática das células mesenquimais

As células criopreservadas foram descongeladas e transferidas para frascos T de cultura de 75 cm² (Greiner bio-one) com 15 mL de volume de meio, na concentração de 2x10⁵ células/mL. As MSC foram mantidas em estufa em condições de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂) para aderência a superfície dos frascos. Após este período, o meio de cultivo foi substituído para remoção das células não aderentes. 50% do volume total do meio de cultivo foi trocado até a confluência de 80 a 90%, quando as células foram colhidas com o auxílio de solução de 0,5% tripsina-

EDTA (*Gibco*®). O sobrenadante foi recolhido após 72 horas da última troca de meio e utilizado nas próximas etapas.

3.9 Caracterização *in vitro* das células estromais mesenquimais

3.9.1 Análise da morfologia

Para a caracterização morfológica, as MSC foram fotografadas por microscopia eletrônica e confocal. Para a análise por imunofluorescência, 2×10^4 células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (*Knittel Glase*, Bielefeld, Alemanha) em placas de 24 poços durante 24 horas. Após esse período, foram lavadas com PBS 1x, fixadas com solução contendo 4% de paraformaldeído (*EM Sciences*, Hatfield, PA) por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas novamente com PBS 1x. Para a marcação do citoesqueleto, as células foram permeabilizadas em 0,1% de Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) diluído em PBS 1x durante 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS 1x por três vezes e incubadas em solução contendo Alexa Fluor 488 Phalloidin (*Invitrogen*) diluída em PBS (5:200) por 50 minutos à TA. Para a marcação do núcleo, as células foram lavadas com PBS 1x por duas vezes e incubadas com DAPI– Hydrochloride (*Cayman Chemical*) à TA por 15 minutos. Ao término da incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount G (*EM Sciences*, Hatfield, PA). As imagens foram capturadas em microscópio confocal *LSM 710 laser scanning microscope* (*Carl Zeiss*) e as análises realizadas no *Software Image J*.

3.9.2 Análise do perfil imunofenotípico e viabilidade

Para a análise do perfil imunofenotípico, 1×10^5 células foram marcadas com 5µL de anticorpos (*Becton Dickinson*) contendo os fluorocromos FITC, PE, PerCP e APC: anti-CD14, anti-CD19, anti-CD34, anti-CD38, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105 e anti-HLA-DR. Os tubos foram incubados durante 15 minutos a TA protegidos da luz. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 400 x g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em 200µL de PBS 1X. Para a análise da viabilidade

foram adicionados 50µL de iodeto de propídio em alíquotas com 1×10^5 células. A aquisição e análise foram realizadas no citômetro *FACS Calibur* (*Becton Dickinson*) e Software *MultiSet* (*Becton Dickinson*).

3.9.3 Diferenciação em linhagens mesodérmicas *in vitro*: adipócitos e osteócitos

A diferenciação foi induzida depois da incubação com meios de diferenciação específicos. Para indução da adipogênese foram utilizados meio α -MEM (*Gibco-BRL*) suplementado com 15% AB HS depletado de EV, 0,2 mM de dexametasona (*Sigma-Aldrich*), 3,44 mM de insulina (*Sigma-Aldrich*) e 0,2 mM de indometacina (*Sigma-Aldrich*), foi observado o aparecimento de vesículas de lipídios visíveis no microscópio de contraste de fase, coradas posteriormente por meio da coloração com o corante *Oil Red-O* (*Sigma-Aldrich*). Por fim, as amostras foram incubadas em isopropanol para remover o corante incorporado. A quantidade de *Oil Red-O* incorporada foi utilizada como quantificação da adipogênese, determinada por leitura de absorbância a 500 nm.

Para a indução da osteogênese foram utilizados meio α -MEM (*Gibco-BRL*) suplementado com 7,5% AB HS depletado de EV, 0,4 mM de ácido ascórbico (*Sigma-Aldrich*), 20 mM de β -glicerofosfato (*Sigma-Aldrich*) e 0,1 mM de dexametasona (*Sigma-Aldrich*), a visualização de deposição mineral de oxalato de cálcio foi realizada em microscópio de contraste de fase, corado posteriormente com o corante *Alizarin Red O* (*Fluka Analytical*). Por fim, o corante vermelho de alizarina foi recuperado com ácido acético e quantificado por leitura de absorbância a 405nm.

3.9.4 Avaliação da proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado a fim de avaliar o crescimento das MSC cultivadas em condições de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). Portanto, 1×10^4 células foram plaqueadas em poços de placas de 6 poços com 3 ml de meio de cultura α -MEM suplementado 10% AB HS normal ou depletado (n= 3 poços por dia de contagem). Durante o experimento não foi realizada a troca ou adição de meio de cultura, e a contagem das células viáveis foi realizada diariamente, por seis dias, utilizando-se Azul de Trypan.

Parte III: Purificação e caracterização das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais.

3.10 Purificação das vesículas extracelulares do sobrenadante de cultura celular

As vesículas extracelulares foram purificadas como descrito anteriormente (Théry *et al.*, 2006). Resumidamente, o sobrenadante da cultura celular foi centrifugado a 300 x *g* durante 10 minutos para sedimentação das células que possam ter soltado no processo. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 2.000 x *g* durante 10 minutos para a sedimentação de células mortas. Em seguida, os debris celulares foram eliminados por centrifugação a 10.000 x *g* durante 30 minutos.

O sobrenadante do passo anterior foi filtrado em filtro de 0,22 µm, seguido de ultracentrifugação a 100.000 x *g* durante 1 hora a 4°C. O *pellet* contendo as vesículas extracelulares foi coletado e lavado por uma etapa de ultracentrifugação a 100.000 x *g* durante 1 hora com PBS, para eliminação de proteínas contaminantes.

3.11 Caracterização das vesículas extracelulares

3.11.1 Avaliação do tamanho e concentração

A avaliação do tamanho e concentração das vesículas extracelulares foi realizada com o uso da tecnologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), utilizando o equipamento o *NanoSight NS300 (Malvern)* e as análises foram realizadas pelo *NanoSight NTA Software v3. 1*. As amostras foram analisadas por gravação de três a cinco vídeos de 30 segundos e o tamanho das EV foi definido como a moda e a média determinada a partir dos vídeos adquiridos.

As análises por NTA foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia do Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, com a supervisão do Prof. Dr. Juliano da Silveira.

3.11.2 Perfil de proteínas

Para o ensaio de perfil de proteínas foram utilizadas as vesículas extracelulares derivadas das células mesenquimais estromais do tecido adiposo e do cordão umbilical, e como controle foi utilizado a célula HeLa, além das próprias células MSC.

As proteínas totais das EV e das células foram extraídas utilizando-se o tampão de extração de proteínas RIPA (*Sigma Life Science*) suplementado com inibidores de protease e fosfatase (*Roche*). Foram adicionados 100 µL e 150 µL de tampão RIPA nas EV e nas células, respectivamente. Em seguida, passaram três vezes pelo processo de sonicação durante 5 minutos intercalados com 5 minutos no gelo e 15 segundos de vórtex. As amostras foram centrifugadas a 18.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e armazenado a -80°C.

As amostras foram quantificadas em microplacas utilizando o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)*, de acordo com instruções do fabricante. Para a construção da curva-padrão realizou-se a diluição seriada a partir de uma solução-padrão fornecida com o kit, composta por BSA 2 mg/mL. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 1 mg/mL, 0,833 mg/mL, 0,666 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,333 mg/mL, 0,166 mg/mL, e 0 mg/mL. O procedimento consistiu em pipetar em cada poço as soluções em duplicata: 15 µL de cada diluição da curva-padrão e 15 µL da amostra e em todos os poços foram adicionados 200 µL de BCA-W®. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 562 nm utilizando o *SpectraMax® M5 (Molecular Devices LLC)*.

As proteínas obtidas das EV e das células foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% (*Mini - PROTEAN® TGX™ Gels, Bio-Rad Laboratories, Inc.*).

Após a eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para membrana de PVDF 0,45 µm (*GE Healthcare*), seguido de incubação por 1 hora em solução de bloqueio constituída de 5% de *Blotting-Grade Blocker* em tampão TBS-T, à temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio, a membrana será incubada com o anticorpo primário específico para cada proteína: CD9, CD63, Alix e citocromo C, *overnight* a 4°C, sob agitação. Em seguida, a membrana será lavada três vezes por 10 minutos em tampão TBS-T, sob agitação em temperatura ambiente e incubada com o anticorpo secundário adequado, por 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação.

A detecção do perfil de proteínas das EV foi realizada utilizando-se o kit Amersham *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante, e captação do sinal de luminescência no aparelho *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software* (Bio-Rad).

Parte IV: Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais.

3.12 Análise do perfil de expressão gênica

As vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo, cultivados na condição de hipóxia e normóxia, foram analisadas quanto a expressão dos genes relacionados a imunomodulação: Prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e Galectina-1 (LGALSS1).

Para isso, o RNA total foi extraído das EV utilizando *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen). Resumidamente, 560 uL do *Buffer AVL* contendo *carrier RNA* foram adicionados em 140 uL de vesículas extracelulares. A solução foi homogeneizada e incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 560 uL de etanol 100% e agitado em vórtex durante 15 segundos. Essa solução foi colocada na coluna *QIAamp Mini column* e centrifugado a 6000 x g por 1 minuto, o filtrado foi descartado. As primeiras etapas foram para lisar as vesículas extracelulares e o RNA ligar-se a membrana de sílica da coluna.

As próximas etapas foram de lavagem para remover os contaminantes e garantir a pureza do RNA. Foram adicionados 500 uL do *Buffer AW1* na coluna e centrifugou a 6000 x g por 1 minuto, o filtrado foi descartado. Em seguida, foram adicionados 500 uL do *Buffer AW2* na coluna e centrifugou a 20.000 x g por 3 minutos, o filtrado foi descartado novamente. Para eluir o RNA, foram adicionados 60 uL de água DEPC na coluna e incubada por 1 minuto em temperatura ambiente. Após esse período, a coluna foi centrifugada a 6000 x g por 1 minuto.

Para a extração do RNA total das MSC foi utilizado *RNeasy mini kit* (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, nas amostras contendo 5×10^6 células foram adicionados 350 µL de Buffer RLT contendo 3,5 µL de β-mercaptoetanol

e homogeneizado. Em seguida, foram adicionados 350µL de etanol 70% e as amostras foram transferidas para as colunas *RNAeasy Mini Spin* e centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos, o filtrado foi descartado. Foram adicionados 700µL de *Buffer RW1* nas colunas e centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos, seguida da adição de 500µL de *Buffer RPE* e novamente centrifugadas. As colunas foram colocadas em novos tubos de 1,5mL, foram adicionados 30µL de água RNase-free e centrifugadas a 8000 x g por 1 minuto. O RNA extraído das EV e das MSC foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoDrop (Thermo Scientific)* no comprimento de onda de 260 nm.

O RNA total foi transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)*, segundo as instruções do fabricante. Para um volume final de 25 µL foram utilizados 2,5 µL de tampão RT (10X), 1 µL de mix de dNTP (100 mM), 2,5 µL de *random primers* (10X), 0,15 µL de RNase out, 1,5 µL da enzima *MultiScribe® MuLV reverse transcriptase*, 1 µg de RNA e água DEPC suficiente para ajustar o volume.

A reação foi transcrita no termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cyber (Life Technologies)* de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 25°C durante 10 minutos seguido por 37°C por 120 minutos. Após a transcrição, o cDNA foi estocado a -20°C.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado a reação de PCR em tempo real pelo método *TaqMan™ Gene Expression Assay (Life Technologies)* e plataforma *ABI 7500 sequence detection (Life Technologies)*. Foram utilizadas sondas específicas para os genes de imunomodulação *PGE2* (Hs00610420_m1), *IDO* (Hs00984148_m1), *LGALS1* (Hs00355202_m1) (*Life Technologies*). A normalização da reação foi realizada pela quantificação dos genes de referência *ACTB* (4310881E) e *GAPDH* (4326317E) (*Applied Biosystems™*).

Na reação foram utilizados 6,25 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2X), 0,625 µL de cada sonda específica (40X), 2 µL de cDNA diluído 1:5 (v/v) e água DEPC suficiente para o volume final de 15 µL de reação. Todas as reações foram realizadas em duplicata e o nível de expressão dos genes foi calculado pelo método de unidades relativas de expressão (URE).

3.12 Ensaio de proliferação de linfócitos T

Para avaliar o potencial de inibição da proliferação de linfócitos T das vesículas extracelulares derivadas das MSC foi utilizado o método de marcação com *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (*Invitrogen*).

O ensaio consistiu em dois co-cultivos: I: Controle MSC: cultivar as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) na presença das células mesenquimais; II: cultivar PBMC na presença das EV derivadas das MSC;

As células mesenquimais derivadas do cordão umbilical e do tecido adiposo foram plaqueadas nas concentrações de 1×10^5 células na placa de 24 poços (1 mL/poço) e incubadas *overnight*, a 37°C e 5% de CO₂, de modo a permitir a adesão das células à placa. As PBMC foram isoladas utilizando a técnica do Ficoll-Paque™ (*GE Healthcare*), conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras de sangue periférico foram diluídas 1:2 em PBS 1X, objetivando um volume final de 30 mL. Foram adicionados 13 mL de Ficoll-Paque™ no fundo de cada tubo contendo as amostras, seguido de centrifugação por 30 minutos a 700 x g, à temperatura ambiente, sem freio. O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado e transferido para outro tubo. Em seguida, foram realizadas duas etapas de lavagem com 50 mL de PBS 1X, com centrifugação por 10 minutos a 450 x g, à temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuspensão em PBS+0,1% albumina humana.

Após a quantificação celular, as células foram marcadas com CFSE (*Invitrogen*) e incubadas durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 (*Gibco*) suplementado com 5% de AB HS depletado de EV e centrifugadas a 450 x g por 10 minutos. As células marcadas foram ressuspensas na concentração de 5×10^5 células/mL utilizando o meio RPMI 1640 (*Gibco*) com 10% de AB HS depletado de EV.

A suspensão de PBMC foi dividida em duas partes: uma com adição do mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µg/mL e a outra sem adição de PHA. Foi adicionado 1 mL da suspensão de PBMC marcados com CFSE e estimulados com PHA em cada poço da placa. Como controle do ensaio, foram cultivadas PBMC na ausência de MSC e EV em três condições: PBMC não marcadas com CFSE, PBMC marcadas com CFSE e não estimuladas com PHA e PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA. No quinto dia de co-cultivo, as

PBMC foram coletadas, marcadas com anticorpos anti-CD3(PE) e anti-CD4(APC) ou anti-CD8(PerCP) (BD Biosciences) e analisados por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de proliferação através da diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE.

3.13 Interação entre vesículas extracelulares e células-alvo

Para demonstrar a interação entre as EV-MSC com os linfócitos T, foi realizado o isolamento das PBMC utilizando a técnica do Ficoll-Paque™ (*GE Healthcare*). As amostras de sangue periférico foram diluídas 1:2 em PBS 1X, objetivando um volume final de 30 mL. Foram adicionados 13 mL de Ficoll-Paque™ no fundo de cada tubo contendo as amostras, seguido de centrifugação por 30 minutos a 700 x g, à temperatura ambiente, sem freio. O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado e transferido para outro tubo. Em seguida, foram realizadas duas etapas de lavagem com 50 mL de PBS 1X, com centrifugação por 10 minutos a 400 x g à temperatura ambiente. As células foram colocadas em placas de 24 poços, na concentração de 5×10^5 células por poço, contendo lamínulas tratadas com poli-lisina, e estimuladas com a adição do mitógeno fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µg/mL.

As EV foram marcadas com PKH26. Resumidamente, as EV foram ressuspensas em 1 mL de diluente C. Separadamente, 1 mL do diluente C foi misturado com 4 µL de PKH26. A suspensão de EV foi misturada com a solução de coloração e incubada por quatro minutos. A reação de marcação foi parada pela adição de 2 mL da solução de 1% de BSA, seguida de ultracentrifugação a 100.000 x g por 70 minutos, lavagem com PBS e ultracentrifugação novamente. Após a marcação, as EV foram colocadas em cultura com os linfócitos por 1 hora. As imagens foram capturadas em microscópio confocal *LSM 710 laser scanning microscope* (*Carl Zeiss*) e as análises realizadas no *Software Image J*.

3.14 Análise dos dados

As imagens adquiridas foram utilizadas para a avaliação qualitativa dos resultados. Na análise estatística foi realizada a comparação das médias obtidas por meio de testes paramétricos ou não paramétricos, de acordo com a distribuição dos dados, e será considerado o nível de significância igual a 0,05, e os dados das análises quantitativas foram apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão.

Resultados

4 RESULTADOS

Parte I: Padronização do protocolo para produção do meio de cultura depletado de vesículas extracelulares.

4.1 Análise do tempo de ultracentrifugação para depleção do soro AB humano

Os meios de cultura utilizados na produção de vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais devem ser desprovidos de vesículas derivadas do soro, pois essas vesículas são internalizadas nas células e influenciam a migração celular, proliferação e diferenciação, além de co-purificarem com as EV de interesse, interferindo na caracterização das EV-MSC e nas futuras aplicações terapêuticas. Para a caracterização físico-química, avaliação do potencial terapêutico e a definição de um possível modo de ação para futuras aplicações clínicas das vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais é necessário condições de culturas definidas que atendem aos padrões de Boas Práticas de Manufatura (BPM).

Neste trabalho, foi proposto otimizar um protocolo de ultracentrifugação para depleção de EV presente no soro AB humano, utilizado para suplementação do meio de cultura. Para avaliar o tempo de rotação necessário para maior depleção possível, foi comparado a concentração de EV presentes no AB HS após diferentes tempos de rotação a 100.000 x g. A avaliação da concentração das vesículas extracelulares presentes no AB HS foi realizada com o uso da tecnologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).

Como descrito na **Tabela 1**, a concentração de partículas após 18 hora de ultracentrifugação foi reduzida em 6,3 vezes quando comparada com o AB HS sem ultracentrifugação (controle).

Tabela 1 - Concentração e tamanho das vesículas do soro AB humano

Tempo de rotação	Concentração (partículas/mL)	Tamanho (nm)
Controle	$3,12 \times 10^{12}$	90,4
Após 16 horas	$2,22 \times 10^{12}$	157,1
Após filtração + 16 horas	$1,54 \times 10^{12}$	97,4
Após 15 horas + filtração + 16 horas	$1,15 \times 10^{11}$	113,8
Após 18 horas	$4,93 \times 10^{11}$	139,0

Fonte: Próprio autor.

No entanto, foi observado que após a ultracentrifugação a $100.000 \times g$, independentemente do tempo de rotação, o AB HS separa-se em 3 fases distintas (**Figura 6**). Apenas a segunda fase, que compreende o maior volume recuperado, foi utilizada para as expansões das MSC. Não podemos excluir que algumas partículas não exossomais também foram retiradas, como agregados de proteínas, lipídios e outras moléculas essenciais para o crescimento.

Figura 6 - Fases do soro AB humano após ultracentrifugação

(A) Tubo utilizado no rotor SW28 (Beckman) contendo soro AB humano após ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 18 horas. (B) Tubos contendo cada fase identificadas como fase1, fase 2 e fase 3, correspondendo a ordem de formação observada. Fonte: Próprio autor.

4.2 Perfil bioquímico do soro AB humano depletado de vesículas extracelulares

Em relação ao perfil bioquímico, foi comparado o lote do soro AB humano, utilizado nos experimentos com as fases formadas após a ultracentrifugação e os dados encontrados por Dos Santos *et al.* (2016). É possível observar que não houve alteração significativa das dosagens entre o controle, a fase 2 e os dados obtidos anteriormente (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Perfil bioquímico do soro AB humano e das fases formadas após a ultracentrifugação

Teste	Controle	Fase 1	Fase 2	Fase 3	AB HS Santos et al.
Ácido úrico (mg/dL)	5,14	4,79	5,32	6,71	5,27
ALT (U/L)	13,06	n.d.	18,19	63,49	13,77
AST (U/L)	12,82	n.d.	11,7	46,25	17,13
Cálcio (mg/dL)	45,55	41,99	47,01	44,57	44,27
Cloro (meq/L)	69,53	72,67	71,36	65,8	80,87
Colesterol (mg/dL)	143,21	133,05	117,04	127,07	127,67
Ferro (µg/dL)	72,48	2,5	71,71	204,12	75,67
Fosfatase alcalina (U/L)	128,38	0,72	87,69	354,33	99,67
Gama GT (U/L)	24,37	n.d.	16,03	56,88	25,67
Glicose (mg/dL)	418,26	393,91	398,22	384,46	440,00
Potássio (meq/L)	5,00	4,82	5,25	5,55	4,50
Proteína Total (g/dL)	6,11	0,45	5,34	15,11	5,60
Sódio (meq/L)	158,56	152,58	160,37	163,54	136,87
Triglicérides (mg/dL)	102,58	327,91	31,77	35,9	89,33
Ureia (mg/dL)	30,28	31,34	31,45	33,06	29,33

AB HS: soro AB humano. n.d. – não determinado. Fonte: Próprio autor.

Parte II: Isolamento e caracterização *in vitro* das células estromais mesenquimais

4.3 Linhagens celulares

As células estromais mesenquimais da medula óssea foram obtidos de três doadores do sexo feminino, com idade entre 18 e 27 anos. As células estromais mesenquimais do cordão umbilical foram obtidos de três doadores, com idade entre 27 e 33 anos, todas provenientes de fetos do sexo masculino. As células estromais mesenquimais do tecido adiposo foram obtidos de três doadores, com idade entre 37 e 65 anos (**Tabela 3**). Todas as células foram cultivadas em meio suplementado com 20% de PHCS, nas condições de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂).

Tabela 3 - Dados dos doadores das amostras das células estromais mesenquimais

Amostra	Idade (anos)	Sexo
BM1 – MSC	21	Feminino
BM2 – MSC	18	Feminino
BM3 – MSC	27	Feminino
UC1 – MSC	33	Feto: Masculino
UC2 – MSC	33	Feto: Masculino
UC3 – MSC	27	Feto: Masculino
AT4 – MSC	43	Feminino
AT5 – MSC	65	Feminino
AT6 – MSC	37	Masculino

Fonte: Próprio autor

4.4 Morfologia

Durante o cultivo, as células estromais mesenquimais derivadas do cordão umbilical, tecido adiposo e medula óssea apresentaram características típicas das MSC, sendo população aderente em plástico, apresentando uma morfologia fibroblastoide alongada, fusiforme e pontiaguda, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante (**Figura 7 - 8**)

Figura 7 - Caracterização morfológica das UC-MSC

A-C) Análise morfológica por microscopia de contraste de fase das células mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), isoladas e expandidas em meio de cultura suplementado com 20% de soro AB humano normal e depletado de vesículas extracelulares, mantida em condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂), após cinco dias de cultivo. Aumento de 40X. As barras de escala representam 200µm. Fonte: Próprio autor.

Figura 8 - Caracterização morfológica das AT-MSC

A-C) Análise morfológica por microscopia de contraste de fase das células mesenquimais do tecido adiposo (AT-MSC), isoladas e expandidas em meio de cultura suplementado com 20% de soro AB humano normal e depletado de vesículas extracelulares, mantida em condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂), após cinco dias de cultivo. Aumento de 40X. As barras de escala representam 200 μm. Fonte: Próprio autor.

No entanto, as células mesenquimais da medula óssea não se adaptaram ao meio de cultura contendo soro AB humano e não confluíram as garrafas, tornando os experimentos seguintes inviáveis, pois não foi possível obter a quantidade mínima de células para prosseguir (**Figura 9**).

Figura 9 - Caracterização morfológica das BM-MSC

Análise morfológica por microscopia de contraste de fase das células mesenquimais da medula óssea isoladas e expandidas em meio de cultura suplementado com 20% de soro AB humano normal e depletado de vesículas extracelulares, mantida em condições de normóxia (21% O₂), após cinco dias de cultivo. Aumento de 50X. As barras de escala representam 100 µm. Fonte: Próprio autor.

As análises por imunofluorescência utilizando microscopia confocal também demonstraram a morfologia fibroblastoide das células mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo cultivados em meio contendo soro AB humano normal e depletado, nas condições de hipóxia e normóxia (**Figura 10**).

Figura 10 - Morfologia fibroblastoide das UC-MSC e AT-MSC por análise confocal

Imagens de microscopia confocal das células mesenquimais derivadas do cordão umbilical e do tecido adiposo, na 5ª passagem. Marcação com DAPI e faloidina evidenciando o núcleo e o citoesqueleto das células, respectivamente. As células foram cultivadas em meio contendo 10% de soro AB humano normal e depletado em condição de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂). Barra = 10µm. Fonte: Próprio autor.

4.5 Perfil imunofenotípico

As células mesenquimais provenientes do cordão umbilical e tecido adiposo foram avaliados quanto à expressão dos marcadores de superfície, quando cultivadas em meio de cultura suplementado com soro AB humano normal e depletado, sob as condições de hipóxia e normóxia. Todas as amostras de células apresentaram mais de 90% de expressão positiva para os marcadores CD90, CD105 e CD73 e menos de 2% para os marcadores CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. O perfil imunofenotípico das MSC cultivadas em meio depletado comparado ao meio controle, nas diferentes tensões de oxigênio, não apresentaram diferenças significativas na expressão de marcadores de superfície específicos para células mesenquimais. **(Figura 11).**

Figura 11 - Perfil imunofenotípico das MSC

A

B

Porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície CD90, CD105, CD73, CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR nas populações de células mesenquimais de cordão umbilical (**A**) e tecido adiposo (**B**) nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂), comparando o meio de cultura suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado de vesículas extracelulares. Fonte: Próprio autor.

4.6 Capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*

As células mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo foram caracterizadas quanto à capacidade de diferenciação *in vitro* após cultivo em meios indutores de diferenciação adipogênica e osteogênica. Além disso, foi avaliado se o meio de cultura depletado e normal, nas condições de cultivo celular de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂), modularia os potenciais adipogênico e osteogênico das MSC.

Com relação à adipogênese, foi observado que após 15 dias de indução as UC-MSC e AT-MSC foram capazes de acumular vesículas lipídicas, evidenciadas pelo corante *oil red-O* (**Figura 12 - 13**). Todas as amostras de MSC foram capazes de se diferenciarem na linhagem adipogênica.

Figura 12 - Capacidade de diferenciação adipogênica das UC-MSC

A - C) Diferenciação adipogênica das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) após 15 dias de indução, cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado de EV, nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂). Coloração: *oil red-O* (vermelho) e hematoxilina (roxo). Barra = 50 µm. Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Capacidade de diferenciação adipogênica das AT-MSC

A - C) Diferenciação adipogênica das células estromais mesenquimais do tecido adiposo (AT-MSC) após 15 dias de indução, cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado de EV, nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂). Coloração: *oil red-O* (vermelho) e hematoxilina (roxo). Barra = 50 µm. Fonte: Próprio autor.

A quantificação do corante *oil red-O* demonstrou que não houve diferença significativa entre UC-MSC induzidas e as não induzidas (controle), independente da utilização de soro AB humano normal ou depletado em ambas as tensões de oxigênio. As AT-MSC apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre as células induzidas e o controle, nas condições de hipóxia e normóxia, utilizando o soro AB humano normal e depletado (**Figura 14**).

Além disso, é possível observar a diferença do potencial de diferenciação entre as UC-MSC e as AT-MSC. Na condição de normóxia, o potencial de diferenciação das AT-MSC é 6,8 vezes maior do que as UC-MSC, quando cultivadas em soro AB humano normal, e 2,4 vezes maior quando cultivadas em soro AB humano depletado. Enquanto na condição de hipóxia, o potencial de diferenciação das AT-MSC é aproximadamente 2 vezes maior do que as UC-MSC quando cultivadas em soro AB humano normal e depletado.

Figura 14 - Comparação da diferenciação adipogênica das UC-MSC e AT-MSC

Quantificação do corante *oil red-O* das células mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) e do tecido adiposo (AT-MSC) induzidas à diferenciação adipogênica. Os dados mostram a comparação da densidade óptica (DO) das células cultivadas em meio suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado, nas condições de normóxia e hipóxia. As barras vermelhas representam as células não induzidas (controle) e as azuis representam as células induzidas. Os resultados foram obtidos a partir da triplicata de cada amostra, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey (*p = 0,05; **p = 0,0016; ***p = 0,0009; ****p < 0,0001). Fonte: Próprio autor.

A comparação dos resultados obtidos com a análise quantitativa da indução adipogênica entre as duas condições de cultivo demonstrou diferenças para as AT-

MSC ($p < 0,0001$), como pode ser observado no gráfico da **figura 15**. Esses resultados mostram que a alteração da concentração de oxigênio de 5% para 21% no cultivo das MSC, especificamente durante o período de indução, proporcionou um aumento de aproximadamente 3,1 (meio normal) e 1,7 (meio depletado) vezes na capacidade de diferenciação adipogênica das AT-MSC, enquanto as UC-MSC não apresentaram diferença significativa quando alterado a concentração de oxigênio.

Figura 15 - Comparação da diferenciação adipogênica das UC-MSC e AT-MSC entre o cultivo em normóxia e hipóxia

Quantificação do corante *oil red-O* das células mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) e do tecido adiposo (AT-MSC) induzidas à diferenciação adipogênica. Os dados mostram a comparação da densidade óptica (DO) das células cultivadas em normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂). As barras vermelhas representam as UC-MSC induzidas e as azuis representam as AT-MSC induzidas. Os resultados foram obtidos a partir da triplicata de cada amostra, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey (* $p = 0,05$; **** $p < 0,0001$). Fonte: Próprio autor

Quanto à osteogênese, foi observado que após 30 dias de indução as UC-MSC e AT-MSC apresentaram deposição de matriz extracelular calcificada, conforme podemos observar pela coloração em vermelho de alizarina (**Figura 16-17**).

Figura 16 - Capacidade de diferenciação osteogênica das UC-MSC

Diferenciação osteogênica das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) após 30 dias de indução, cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado de EV, na condição de normóxia (21% O₂). A matriz extracelular calcificada produzida pelas MSC foram coradas em vermelho. Coloração: vermelho de alizarina. Barra = 100 µm. Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Capacidade de diferenciação osteogênica das AT-MSC

Diferenciação osteogênica das células estromais mesenquimais do tecido adiposo (AT-MSC) após 30 dias de indução, cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado de EV, na condição de normóxia (21% O₂). A matriz extracelular calcificada produzida pelas MSC foram coradas em vermelho. Coloração: vermelho de alizarina. Barra = 100 μm. Fonte: Próprio autor.

A análise quantitativa da diferenciação osteogênica não demonstrou diferenças entre as populações de UC-MSC induzidas, nos cultivos em meio suplementado com soro AB humano normal e depletado e seus respectivos grupos controle. As AT-MSC apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$ e $p = 0,05$) entre as células induzidas e o controle, e não houve diferença significativa entre no potencial de diferenciação

entre as células cultivadas em meio de cultura suplementado com soro AB humano normal e depletado. No entanto, foi observado que a AT 4-MSC apresenta o potencial de diferenciação 20 vezes menor que as AT5-MSC e AT6-MSC, em soro AB humano normal, e 10 vezes menor em soro AB humano depletado. (**Figura 18**).

Além disso, é possível observar a diferença do potencial de diferenciação entre as UC-MSC e as AT-MSC. Na condição de normóxia, o potencial de diferenciação das AT-MSC é 20,5 vezes maior do que as UC-MSC, quando cultivadas em soro AB humano normal, e 7,3 vezes maior quando cultivadas em soro AB humano depletado.

Figura 18 - Comparação da diferenciação osteogênica das UC-MSC e AT-MSC

Quantificação do corante vermelho de alizarina das células mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) e do tecido adiposo (AT-MSC) induzidas à diferenciação adipogênica. Os dados mostram a comparação da densidade óptica (DO) das células cultivadas em meio suplementado com 10% de soro AB humano normal e depletado, na condição de normóxia. As barras vermelhas representam as células não induzidas (controle) e as azuis representam as células induzidas. Os resultados foram obtidos a partir da triplicata de cada amostra, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey (*p = 0,05; ****p < 0,0001). Fonte: Próprio autor.

4.7 Proliferação e viabilidade celular

As UC-MSC e AT-MSC foram comparadas em relação ao seu potencial proliferativo e viabilidade. Adicionalmente, avaliamos se o cultivo celular em condição de hipóxia (5% O₂) acarretaria em alterações na proliferação e viabilidade das células com relação ao cultivo em normóxia (21% O₂).

A **figura 19** mostra o número de células viáveis ao longo do cultivo em normóxia e hipóxia. É possível observar que a partir do número de células plaqueadas (0 horas), houve uma diminuição na quantidade de células obtida na primeira contagem realizada após 24 horas, sugerindo que parte das células plaqueadas não aderiram à superfície da garrafa de cultivo. Ao final do experimento (após 144 horas), a média do número de UC-MSC e AT-MSC foi aproximadamente 4 vezes maior que a quantidade de células plaqueadas. Não houve diferença significativa entre o número de células viáveis cultivadas em normóxia e hipóxia.

Figura 19 - Potencial proliferativo das MSC em normóxia e hipóxia

Número de células mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), representado por círculo, e do tecido adiposo (AT-MSC), representado por triângulo, obtido diariamente durante 144 horas de cultivo em meio suplementada com 10% de soro AB humano normal, representado por vermelho, e soro AB humano depletado de EV, representado por azul, em condição de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂). Os dados apresentados são referentes aos resultados da contagem de células isoladas de três doadores e a média relativa a cada uma delas foi obtida com triplicatas experimentais. As barras representam o desvio padrão. Fonte: Próprio autor.

Após o cultivo das células mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo em meio de cultura depletado e normal (controle), foi realizada a quantificação da viabilidade celular por citometria de fluxo para avaliar se o protocolo de ultracentrifugação do soro AB humano afetaria a proliferação e manutenção dessas células. As UC-MSC, em condição de normóxia, cultivadas em meio controle apresentaram média de $97,67 \pm 2,21\%$ de células viáveis e as cultivadas em meio depletado apresentaram média de $96,37 \pm 2,77\%$ de células viáveis. Enquanto na condição de hipóxia, as UC-MSC cultivadas em meio controle apresentaram média de $97,07 \pm 1,29\%$ de células viáveis e as cultivadas em meio depletado apresentaram média de $96,20 \pm 1,57\%$ de células viáveis. Portanto, não houve diferença significativa quando comparadas as diferentes condições de cultivo (**Figura 20**).

Figura 20 - Viabilidade das UC-MSC

Porcentagem de células mesenquimais do cordão umbilical viáveis nas diferentes condições de cultivo. As barras azuis representam as células cultivadas em normóxia (21% de O₂) e as barras vermelhas representam as células cultivadas em hipóxia (5% O₂). Para análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Próprio autor.

As AT-MSC, em condição de normóxia, cultivadas em meio controle apresentaram média de $91,70 \pm 2,91\%$ de células viáveis e as cultivadas em meio depletado apresentaram média de $91,50 \pm 3,17\%$ de células viáveis. Enquanto na condição de hipóxia, as AT-MSC cultivadas em meio controle apresentaram média de $100,0 \pm 0,0\%$ de células viáveis e as cultivadas em meio depletado apresentaram média de $99,23 \pm 1,0\%$ de células viáveis. Portanto, não houve diferença significativa quando comparadas as diferentes condições de cultivo (**Figura 21**).

Figura 21 - Viabilidade das AT-MSC

Porcentagem de células mesenquimais do tecido adiposo viáveis nas diferentes condições de cultivo. As barras azuis representam as células cultivadas em normóxia (21% de O₂) e as barras vermelhas representam as células cultivadas em hipóxia (5% O₂). Para análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Próprio autor.

Parte III: Purificação e caracterização das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais.

4.8 Avaliação do tamanho e da concentração das vesículas extracelulares

Após a purificação das vesículas extracelulares presentes no meio de cultura das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e do tecido adiposo (EV-AT-MSC), a partir da técnica de centrifugação diferencial, foi realizada a avaliação do tamanho e concentração das EV, nas condições de normóxia (21%O₂) e hipóxia (5%O₂) pela tecnologia de Rastreamento de Nanopartículas.

As EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC, na condição de normóxia, apresentaram partículas com moda de tamanho de $150,3 \pm 19,1$ nm e $131,3 \pm 20,5$ nm, respectivamente. Enquanto na condição de hipóxia, as EV-UC-MSC apresentaram moda de tamanho de $146,3 \pm 6,4$ nm e as EV-AT-MSC apresentaram $132,7 \pm 35,2$ nm. Não observamos diferenças significativas nas diferentes fontes de EV e condições de cultivo (**Figura 22**).

Figura 22 - Distribuição do tamanho das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais de duas fontes

Avaliação da distribuição do tamanho das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e das vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo (EV-AT-MSC) de três amostras, nas condições de normóxia (21% O₂), representado em vermelho, e hipóxia (5% O₂), representado em azul, utilizando a tecnologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas. A barra representa a média do tamanho das amostras, e a escala foi expressa em nanômetros (nm). Para análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey
Fonte: Próprio autor.

Outro parâmetro avaliado foi a concentração de partículas por mililitro (partículas/mL) das EV isoladas dos dois tipos celulares. Na condição de normóxia, as EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC apresentaram média de concentração de $3,9 \times 10^{11} \pm 4,0 \times 10^{11}$ partículas/mL e $1,7 \times 10^{11} \pm 6,4 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente. Enquanto na condição de hipóxia, as EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC apresentaram média de concentração de $3,3 \times 10^{11} \pm 1,3 \times 10^{11}$ partículas/mL e $1,1 \times 10^{11} \pm 5,1 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente. A análise estatística não apresentou diferença significativa quando comparadas as diferentes fontes de EV e as diferentes condições de cultivo (**Figura 23**).

Figura 23 - Distribuição da concentração das vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais de duas fontes

Avaliação da concentração das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e das vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo (EV-AT-MSC) de três amostras, nas condições de normóxia (21% O₂), representado em vermelho, e hipóxia (5% O₂), representado em azul, utilizando a tecnologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas. A concentração foi expressa como o número de partículas (10¹¹ – 10¹²) por mililitro (mL). Para análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey Fonte: Próprio autor.

4.9 Perfil de proteínas presentes nas vesículas extracelulares

A identificação de proteínas comumente detectadas em exossomos foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. Para este ensaio foram utilizadas as proteínas extraídas das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC1-MSC, EV-UC2-MSC, EV-UC3-MSC) e as derivadas das células estromais mesenquimais do tecido adiposo (EV AT4-MSC, EV AT5-MSC e EV AT6-MSC). Além disso, como controle foram utilizadas as proteínas extraídas de células da linhagem HeLa e das células estromais mesenquimais do tecido adiposo (AT-MSC) e do cordão umbilical (UC-MSC).

As EV-AT-MSC e as EV-MCU apresentaram a expressão da proteína transmembrana CD9 (22 kDa) e CD63 (26 kDa). Já a proteína citosólica Alix (95 kDa) foi expressa nas EV-UC-MSC e apresentou um fraco sinal de expressão nas EV-AT-MSC, nas condições de normóxia e hipóxia (**Figura 24**).

Figura 24 - Nível de expressão de proteínas comumente detectadas em exossomos por *Western Blotting*

Avaliação da expressão de marcadores exossomais utilizando anticorpos com especificidade para Alix, CD9 e CD63. Para isso 20 µg de proteína das vesículas extracelulares foram analisados em gel de poliacrilamida 10%. Os tamanhos das bandas de interesse estão indicados à direita em quilodaltons (kDa). **A)** Perfil de proteínas presentes nas vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical, nas condições de normóxia (21% O₂), representado pelo N, e hipóxia (5% O₂), representado pelo H. **B)** Perfil de proteínas presentes nas vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais de tecido adiposo, nas condições de normóxia (21% O₂), representado pelo N, e hipóxia (5% O₂), representado pelo H. Como controle foram utilizadas proteínas extraídas das respectivas células (UC-MSC e AT-MSC) e das células da linhagem Hela, de acordo com as instruções do fabricante dos anticorpos. Fonte: Próprio autor.

Parte IV: Análise funcional das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais.

4.10 Expressão de genes relacionados à imunomodulação presentes nas vesículas extracelulares

A capacidade das MSC de controlar respostas imunológicas tem sido uma das abordagens mais atrativa e relevante na terapia, principalmente no tratamento de

doenças inflamatórias e autoimunes. Os mecanismos imunomodulatórios envolvem a expressão de moléculas como *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), prostaglandina E2 (PGE2) e galectina 1 (LGALS1). Desta forma, analisamos a expressão destes genes nas amostras de MSC e em suas respectivas EV, nas condições de normóxia e hipóxia (Figura 25).

Figura 25 - Expressão de genes relacionados com a imunorregulação nas MSC e EV

Quantificação por PCR em tempo real da expressão dos genes prostaglandina E2 (*PGE2*) e galectina 1 (*LGALS1*) em células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), do tecido adiposo (AT-MSC) e nas vesículas extracelulares (EV-UC-MSC e EV-AT-MSC). Os dados são apresentados como unidade relativa de expressão (URE) e representam as médias de ensaios em duplicata. Para análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Próprio autor.

As moléculas imunorregulatórias LGALS1 e PGE2 foram expressas nas MSC e nas suas respectivas vesículas extracelulares. No entanto, na condição de normóxia, a LGALS1 apresentou-se 2 vezes mais expressa nas EV-MCU e 6 vezes mais expressas nas EV-AT-MSC, comparado às células. Na condição de hipóxia, a LGALS1 estava 3 vezes mais expressa nas EV-AT-MSC em relação as AT-MSC, enquanto as UC-MSC apresentaram 3 vezes mais expressão em comparação com as EV-UC-MSC. A molécula IDO apresentou baixa expressão nas células e não apresentou expressão nas vesículas extracelulares, em ambas as tensões de oxigênio.

4.11 Potencial de imunomodulação das vesículas extracelulares

Além de avaliar a expressão de genes imunomoduladores nas EV, foi analisado o potencial de inibição da proliferação de linfócitos T das vesículas extracelulares derivadas das MSC por meio de ensaio funcional. Para tanto, foi utilizado o método de marcação com *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE). PBMC foram isoladas, marcadas com CFSE, estimuladas ou não com fitohemaglutinina (PHA) e cultivadas na presença ou ausência de vesículas extracelulares e/ou MSC. Após cinco dias de co-cultivo, a análise por citometria de fluxo da porcentagem de proliferação de PBMC estimuladas com PHA foi de $52,4 \pm 10,8\%$ para linfócitos T CD4⁺ e $73,5 \pm 8,3\%$ para linfócitos T CD8⁺ (**Figura 26**).

O co-cultivo I consistiu em cultivar PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA na presença de $1,0 \times 10^5$ células estromais mesenquimais do cordão umbilical ou do tecido adiposo na proporção celular 1:5. Esse co-cultivo foi denominado de “Controle MSC”, pois representa a habilidade das MSC em suprimir a proliferação dos linfócitos T, sem adição de outros fatores que poderiam contribuir para essa resposta.

As médias das porcentagens de proliferação de PBMC cultivadas na presença de UC-MSC e AT-MSC foram de $5,9 \pm 1,8\%$ e $6,9 \pm 1,9\%$, respectivamente, para linfócitos T CD4⁺, e $10,9 \pm 3,0\%$ e $16,0 \pm 5,0\%$, respectivamente, para linfócitos T CD8⁺. Observamos que as MSC possuem a capacidade de diminuir a proliferação de linfócitos T alogênicos de forma significativa ($p < 0,0001$) (**Figura 26**). A porcentagem de proliferação de linfócitos CD4⁺ foi aproximadamente 9 vezes menor quando

cultivadas na presença de UC-MSC e 8 vezes menor quando cultivadas na presença de AT-MSC. Já a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi aproximadamente 7 vezes menor quando cultivadas na presença de UC-MSC e 5 vezes menor quando cultivadas na presença de AT-MSC.

No entanto, não foi encontrada diferença significativa quando comparamos a porcentagem de inibição da proliferação entre as diferentes fontes de MSC (UC-MSC e AT-MSC).

Figura 26 - Análise da proliferação de células T utilizando UC-MSC e AT-MSC

Foram cultivadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) marcadas com CFSE e estimuladas com PHA na presença de $1,0 \times 10^5$ células estromais mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC) e do tecido adiposo (AT-MSC). **(A)** As UC-MSC e as AT-MSC foram capazes de inibir significativamente a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ (**** $p < 0,0001$). **(B)** As UC-MSC e as AT-MSC foram capazes de inibir significativamente a proliferação de linfócitos T CD8⁺ (**** $p < 0,0001$). As barras pretas representam a porcentagem de proliferação das PBMC marcadas e estimuladas cultivadas sem a presença de MSC, correspondendo ao controle positivo (CT), as barras cinza-claros representam as amostras de UC-MSC e as barras cinza escuro representam as amostras de AT-MSC. Os resultados foram feitos em triplicata para cada amostra. Para análise estatística foi utilizado o método ANOVA, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Próprio autor.

O co-cultivo II consistiu em cultivar PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA na presença das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e do tecido adiposo (EV-AT-MSC), sem a presença de MSC. Neste co-cultivo foram utilizadas diferentes concentrações das EV (50 μ g, 100 μ g e 150 μ g) com o intuito de avaliar o efeito imunomodulatório que as EV exercem na proliferação de linfócitos T.

Observamos que as EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC possuem a capacidade de diminuir a proliferação de linfócitos T alogênicos de forma significativa ($p < 0,0001$ e $p = 0,0069$) em relação ao controle positivo (PBMC+CFSE+PHA). No entanto, a EV-

AT-MSC na concentração de 50 µg não apresentou diferença significativa na porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos T CD8⁺ (**Figura 27**).

Na concentração de 50 µg de EV, a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4⁺ foi aproximadamente 2,1 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC e 1,2 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-AT-MSC em relação ao controle positivo. A porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi aproximadamente 1,5 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC em relação ao controle positivo.

Na concentração de 100 µg de EV, a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4⁺ foi aproximadamente 2,7 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC e 1,7 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-AT-MSC em relação ao controle positivo. A porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi aproximadamente 1,9 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC e 1,2 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-AT-MSC em relação ao controle positivo.

E na concentração de 150 µg de EV, a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4⁺ foi aproximadamente 3,4 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC e 1,9 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-AT-MSC em relação ao controle positivo. A porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi aproximadamente 2,8 vezes menor quando cultivadas na presença de UC-MSC e 1,3 vezes menor quando cultivadas na presença de AT-MSC em relação ao controle positivo.

Figura 27 - Análise da proliferação de células T utilizando EV-UC-MSC e EV-AT-MSC

Foram cultivadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) marcadas com CFSE e estimuladas com PHA na presença das vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e do tecido adiposo (EV-AT-MSC) em diferentes concentrações das EV (50 µg, 100 µg e 150 µg). **(A)** As EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC foram capazes de inibir significativamente a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ (**** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0069$) nas três diferentes concentrações. **(B)** As EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC foram capazes de inibir significativamente a proliferação de linfócitos T CD8⁺ (**** $p < 0,0001$) nas três diferentes concentrações. As barras pretas representam a porcentagem de proliferação das PBMC marcadas e estimuladas cultivadas sem a presença de MSC, correspondendo ao controle positivo, as barras cinza-claros representam as amostras de EV-UC-MSC e as barras cinza escuro representam as amostras de EV-AT-MSC. Os resultados foram feitos em triplicata para cada amostra. Para análise estatística foi utilizado o método ANOVA, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Próprio autor.

O co-cultivo III consistiu em cultivar PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA na presença de 100µg de vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e tecido adiposo (EV-AT-MSC) cultivadas nas condições de normóxia e hipóxia, sem a presença de MSC.

Neste co-cultivo foram realizados três tratamentos diferentes (1, 3 e 5 doses de EV- MSC) com o intuito de avaliar se o pré-tratamento das MSC e a quantidade de doses pode influenciar o efeito imunomodulatório que as EV exercem na proliferação dos linfócitos T (**Figura 28**).

Foi possível observar que no tratamento 1 a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4⁺ foi aproximadamente 7 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC, em ambas as condições de cultivo, 8 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-AT-MSC na condição de normóxia e 5 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-AT-MSC na condição de hipóxia. Enquanto, no tratamento 2 a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4⁺ foi aproximadamente 8 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC e EV-AT-MSV, em ambas as condições de cultivo e 9 vezes menor no tratamento 3.

A porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi de aproximadamente 2 vezes menor quando cultivadas na presença de EV-UC-MSC e EV-AT-MSC, em ambas as condições de cultivo. Os diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa na porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos T CD8⁺.

Figura 28 - Análise da proliferação de células T utilizando EV-UC-MSC e EV-AT-MSC nas condições de normóxia e hipóxia

Foram cultivadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) marcadas com CFSE e estimuladas com PHA na presença de 100 µg de vesículas extracelulares derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical (EV-UC-MSC) e do tecido adiposo (EV-AT-MSC), cultivadas nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂). Foram realizados diferentes tratamentos: Tratamento 1 (T1) uma dose de EV-MSC. Tratamento 2 (T2) três doses de EV-MSC. Tratamento 3 (T3) 5 doses de EV-MSC. **(A)** As EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC foram capazes de inibir significativamente a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ (**** p<0,0001) nos três diferentes tratamentos. **(B)** As EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC foram capazes de inibir significativamente a proliferação de linfócitos T CD8⁺ (**** p<0,0001) nos três diferentes tratamentos. As barras cinzas representam a porcentagem de proliferação das PBMC marcadas e estimuladas cultivadas sem a presença de MSC, correspondendo ao controle positivo, as barras vermelhas representam as amostras de EV-UC-MSC cultivadas em normóxia, as barras laranjas representam as amostras de EV-UC-MSC cultivadas em hipóxia, as barras azuis representam as amostras de EV-AT-MSC cultivadas em normóxia e as barras verdes representam as amostras de EV-AT-MSC cultivadas em hipóxia. Os resultados foram feitos em triplicata para cada amostra. Para análise estatística foi utilizado o método ANOVA, utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Próprio autor.

4.12 Interação das vesículas extracelulares com as células-alvo

Para avaliar a interação das vesículas extracelulares com os linfócitos T, foi realizado a marcação das EV derivadas das células estromais mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo, cultivado sob a condição de normóxia e hipóxia, com o corante PKH26 *Fluorescent Cell Linker Kit* (*Sigma-Aldrich*). As EV marcadas foram co-cultivadas com as células mononucleares do sangue periférico por 1 hora e como controle foi utilizado as PBMC sem adição de EV-MSC. Foi avaliado o comportamento das EV ao longo do tempo.

As **figuras 29 e 30** apresentam a comparação das PBMC após o tratamento com o meio de cultura contendo EV derivadas das UC-MSC, nas condições de normóxia e hipóxia, respectivamente. Enquanto as **figuras 31 e 32**, representam a interação das EV derivadas AT-MSC, nas condições de normóxia e hipóxia, respectivamente.

Analizando as imagens da microscopia confocal foi possível observar que as EV de ambas as fontes podem ser internalizadas pelas PBMC. No entanto, as EV apresentaram diferentes intensidades de fluorescência ao longo do tempo. As EV-UC-MSC, na condição de normóxia, apresentaram intensidade da fluorescência constante ao longo do tempo. Já nas EV-UC-MSC, na condição de hipóxia, a intensidade de fluorescência foi maior em 30 minutos, com redução gradual nos tempos seguintes.

As EV-AT-MSC, na condição de normóxia, apresentaram aumento da intensidade da fluorescência a partir de 40 minutos de interação e foi mantida até 60 minutos. Enquanto EV-AT-MSC, na condição de hipóxia, expressou baixa intensidade de fluorescência ao longo do tempo.

Figura 29 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de UC-MSC em normóxia

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimulados com fitohemaglutinina e co-cultivadas, sob lamínulas tratadas com poli-lisina durante 1 horas com vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do cordão umbilical obtidas do cultivo em normóxia (21% O₂), marcadas com o corante PKH26 (vermelho). A cada 10 minutos as células foram fixadas, coradas com DAPI (azul) e actina (verde) para evidenciar as estruturas das células. A análise da interação foi realizada a partir das imagens de microscopia confocal Escala: 2µm. Fonte: Próprio autor.

Figura 30 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de UC-MSC em hipóxia

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimulados com fitohemaglutinina e co-cultivadas, sob lamínulas tratadas com poli-lisina durante 1 horas com vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do cordão umbilical obtidas do cultivo em hipóxia (5% O₂), marcadas com o corante PKH26 (vermelho). A cada 10 minutos as células foram fixadas, e em seguida coradas com DAPI (azul) e actina (verde) para evidenciar as estruturas das células. A análise da interação foi realizada a partir das imagens de microscopia confocal Escala: 2µm. Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de AT-MSC em normóxia

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimulados com fitohemaglutinina e co-cultivadas, sob laminulas tratadas com poli-lisina durante 1 horas com vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do tecido adiposo obtidas do cultivo em normóxia (21% O₂), marcadas com o corante PKH26 (vermelho). A cada 10 minutos as células foram fixadas, coradas com DAPI (azul) e actina (verde) para evidenciar as estruturas das células. A análise da interação foi realizada a partir das imagens de microscopia confocal Escala: 2µm. Fonte: Próprio autor.

Figura 32 - Interação das vesículas extracelulares derivadas de AT-MSC em hipóxia

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimulados com fitohemaglutinina e co-cultivadas, sob laminulas tratadas com poli-lisina durante 1 horas com vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do tecido adiposo obtidas do cultivo em hipóxia (5% O₂), marcadas com o corante PKH26 (vermelho). A cada 10 minutos as células foram fixadas, coradas com DAPI (azul) e actina (verde) para evidenciar as estruturas das células. A análise da interação foi realizada a partir das imagens de microscopia confocal Escala: 2µm. Fonte: Próprio autor.

Discussão

5 DISCUSSÃO

As células estromais mesenquimais têm sido utilizadas em um grande número de ensaios clínicos devido às suas propriedades em controlar as respostas imunológicas, principalmente para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. Essa atividade de imunomodulação das MSC é em grande parte mediada por fatores parácrinos, dentre os quais, considera-se que as vesículas extracelulares desempenham um papel importante na comunicação entre MSC e a célula-alvo.

No entanto, muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas, como a caracterização e avaliação da atividade terapêutica das EV em condições livres de xenoantígenos. Portanto, visando atender os padrões de Boas Práticas de Manufatura (BPM), bem como a futura aplicação terapêutica das EV derivadas das MSC, as condições de cultura devem ser isentas de derivados animais e xenoantígenos. Assim, o uso do soro AB humano, no preparo do meio de cultura utilizados para expandir as MSC e isolar as EV, evita a contaminação por patógenos animais e diminui as reações imunes dos pacientes.

Dos Santos *et al.* (2016) demonstraram que o soro AB humano pode ser utilizado de maneira segura e eficiente para a expansão de MSC de diversas fontes, tanto em monocamada quanto em frascos *spinner*. O AB HS é produzido a partir de bolsas de plasma AB que seriam enviadas para a indústria de fracionamento de sangue ou descartadas, pois não há indicação clínica para esse produto. Outro ponto importante, é o reduzido risco associado ao uso do soro AB humano, pois os componentes do sangue humano estão em uso clínico há anos, e são derivados de doadores de sangue saudáveis e testados de acordo com os padrões de bancos de sangue para parâmetros infecciosos e imunológicos (BIEBACK, K., 2013).

No entanto, o meio de cultura utilizado para produção de EV deve ser desprovido de vesículas derivadas do soro, pois essas vesículas são internalizadas nas células e influenciam a migração celular, proliferação e diferenciação, interferindo na caracterização das EV-MSC (SHELKE et al., 2014).

No presente trabalho, foi descrito um protocolo de ultracentrifugação a 100.000 x g do soro AB humano por 18 horas, para a produção do meio de cultura livre de substâncias xenogênicas e empobrecido de EV. Este protocolo de depleção de EV do soro demonstrou ser eficiente em termos de eliminação de nanopartículas, reduzindo em 6,3 vezes a concentração de partículas após a ultracentrifugação, quando

comparado com ao soro AB humano sem ultracentrifugação (controle). Contudo, não podemos excluir que algumas partículas não exossomais também foram retiradas, como agregados de proteínas, lipídios e outras moléculas essenciais para o crescimento.

Em contraste, uma redução equivalente do conteúdo geral de nanopartículas foi relatada na preparação de meios de cultura suplementados com soro fetal bovino empobrecido de vesículas extracelulares. Foi descrito que após 4 horas de ultracentrifugação a 120.000 x *g* houve uma redução de 5,3 vezes na concentração de partículas do soro fetal bovino (EITAN *et al.*, 2015).

No entanto, outros protocolos de depleção de SFB demonstraram que após ultracentrifugação a 120.000 x *g* por 18 horas, foram removidos, aproximadamente, 95% de vesículas extracelulares contendo RNA, reduzindo a funcionalidade das EV do SFB, como observado durante a migração celular concluindo que protocolos mais curtos apenas reduziram a presença de EV derivados do SFB no meio de cultura de células em uma extensão menor, o que ainda pode apresentar efeitos significativos na fisiologia e fenótipo celular (SHELKE *et al.*, 2014).

Como alternativa às condições de cultura utilizando soro fetal bovino para investigação e produção de EV derivadas de células estromais mesenquimais, foi descrito o uso de meio suplementado com lisado de plaquetas humanas (pHPL). O esgotamento de EV do meio de crescimento foi obtido por centrifugação a 120.000 *g* por 3 h, o que reduziu as EV de pHPL contendo RNA abaixo do limite de detecção (PACHLER *et al.*, 2017). No entanto, o rendimento da produção de lisado de plaquetas é inferior ao rendimento obtido na produção do soro AB humano, de aproximadamente 96% (FEKETE *et al.*, 2012. DOS SANTOS *et al.*, 2016), o que torna vantajoso o uso do AB HS em nosso grupo de pesquisa.

O uso de plasmas de banco de sangue favorece a qualidade do soro produzido por tratar-se de um produto pré-selecionado devido a criteriosa triagem dos doadores, conforme a legislação vigente (Portaria Normativa nº 2.712 de 12 de novembro de 2013), diminuindo a variabilidade lote a lote dos constituintes bioquímicos. A qualidade do soro deve ser controlada para garantir a segurança na utilização em pacientes.

Portanto, após a ultracentrifugação do soro AB humano, foi necessário realizar a análise do seu perfil bioquímico e comparar com o soro que não foi submetido a ultracentrifugação. A avaliação desse parâmetro de qualidade revelou que o soro depletado apresenta as características necessárias para ser utilizado na produção das

células destinadas à terapia celular, pois não houve alteração significativa das dosagens entre o controle, a fase 2 do soro AB humano depletado e os dados obtidos por Dos Santos *et al.* (2016).

Em seguida, o soro AB humano foi utilizado para isolar e cultivar as células estromais mesenquimais de três fontes: medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo. Durante o cultivo, as células mesenquimais da medula óssea não se adaptaram ao meio de cultura contendo soro AB humano e não proliferaram suficientemente, tornando os experimentos seguintes inviáveis. Assim, este trabalho prosseguiu apenas com as células mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo.

Para avaliar o efeito da depleção das EV do soro na expansão das MSC, essas células foram comparadas quando cultivadas em meio normal e meio depletado. As MSC das diferentes fontes apresentaram as características típicas dessas células, sendo uma população aderente em plástico, com morfologia fibroblastoide alongada, expressão positiva para os marcadores CD90, CD105 e CD73 e negativa para os marcadores CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. Também não foi observado diferenças em relação ao potencial de proliferação, viabilidade e propriedades de diferenciação das MSC quando cultivadas em meio de cultura suplementado com soro AB humano depletado de EV em relação ao soro normal. Portanto, o meio depletado não interfere nas características das MSC, podendo ser usado para a expansão das células visando a produção de vesículas extracelulares derivadas das MSC.

Dados contrários foram publicados por Eitan *et al.* (2015), que demonstraram um crescimento celular reduzido quando utilizado SFB depletado de EV, uma vez que a ultracentrifugação em tempos longos pode retirar do soro moléculas responsáveis pelo crescimento, como proteínas e nutrientes, aumentando o estresse celular. Além disso, as vesículas depletadas são um potencial veículo de liberação de fatores de crescimento do soro para as células. No entanto, as células mesenquimais foram capazes de se adaptar ao meio de cultura suplementado com soro AB humano empobrecido de vesículas extracelulares.

Vários protocolos para depleção de EV derivadas de soro fetal bovino estão disponíveis na literatura, mas o uso de soro AB humano depletado de EV não foi relatado até o momento. Portanto, os resultados encontrados representam um grande avanço na produção de EV-MSC em condições compatíveis com a produção de um

produto mais seguro e eficiente, com baixos riscos de reações alergênicas e imunogênicas e transmissão de agentes patogênicos ao paciente.

Além da utilização do meio de cultura livre de xenoantígenos, pesquisadores têm buscado diferentes estratégias para melhorar os efeitos terapêuticos das MSC, e consequentemente das EV derivadas das MSC. Essas estratégias incluem a otimização da fonte (fontes alogênicas ou autólogas, da medula óssea, do cordão umbilical ou adiposo), pré-condicionamento (físico, químico ou biológico), via de administração (intravenosa, intra-arterial ou local), tempo (pré-cirurgia ou pós-cirurgia) e frequência (única injeção ou múltiplas injeções) de terapias com MSC (ZHAO *et al.*, 2020).

O pré-condicionamento é uma estratégia que tem gerado muito interesse, e baseia-se em uma variedade de técnicas para aumentar a capacidade das células durante a expansão *ex vivo*. Os métodos de pré-condicionamento disponíveis incluem hipóxia, incubação com agentes farmacológicos/químicos ou fatores tróficos/citocinas, fatores físicos e modificação genética. Por meio do pré-tratamento adequado das MSC antes da infusão, suas habilidades proliferativas, secretoras, migratórias e de diferenciação podem ser melhoradas, favorecendo resultados benéficos *in vivo* (HU *et al.*, 2018).

Neste trabalho foi adotado o pré-condicionamento por hipóxia (5% O₂), com o intuito de avaliar se as diferenças nas tensões de oxigênio afetariam a produção e propriedades imunomoduladoras das vesículas extracelulares derivadas das células mesenquimais das diferentes fontes. Primeiramente, foi avaliado se a condição de hipóxia era capaz de alterar as características típicas das MSC, em comparação com a condição padrão de cultura *in vitro* (normóxia – 21% O₂). Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa em relação a morfologia, perfil imunofenotípico e viabilidade das células mesenquimais cultivadas em normóxia e hipóxia. No entanto, foi observado que as AT-MSc apresentaram maior capacidade de diferenciação na condição de normóxia. Resultados semelhantes foram descritos por Beegle *et al.* (2015), que demonstraram que a hipóxia exerceu um efeito inibitório na diferenciação das MSC derivadas da medula óssea humana, proporcional ao grau de hipóxia.

Um dos aspectos bastante controversos no estudo das EV está relacionado ao método de isolamento, como já mencionado vários métodos são propostos. A ultracentrifugação baseia-se na separação das vesículas por tamanho e foi o método

eleito neste trabalho devido ao grande volume de sobrenadante de cultura utilizado nos ensaios. Porém, esse método apresenta desvantagens como baixa concentração e pureza de vesículas.

Após o isolamento de EV do sobrenadante de cultura de células estromais mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo, foram avaliados três pontos importantes para a elucidação das características e dos efeitos das EV derivadas das MSC. As EV-MSC isoladas foram caracterizadas quanto à expressão de proteínas e tamanho comumente detectados em exossomos. Também foi avaliado a expressão de genes envolvidos na imunorregulação presentes nas EV e o seu potencial de inibição e interação com linfócitos T, nas condições de normóxia e hipóxia.

Para a caracterização das EV, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) preconizou requisitos experimentais mínimos, como a identificação do tamanho, a presença ou ausências de alguns tipos de proteínas, bem como a avaliação da morfologia (LÖTVALL et al., 2014). Para a identificação do tamanho e concentração foi utilizado a Análise de Rastreamento de Nanopartículas, que permitiu observar que as EV derivadas das células mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo apresentaram tamanho de aproximadamente 150 nm e 131 nm, respectivamente, na condição de normóxia, e 146 nm e 133 nm, na condição de hipóxia. Portanto, não houve diferença significativa no tamanho das vesículas extracelulares nas diferentes tensões de oxigênio, e esses valores estão de acordo com o tamanho dos exossomos descrito na literatura (GANGODA et al., 2014).

As EV-UC-MSC apresentaram média de concentração de aproximadamente $3,9 \times 10^{11}$ partículas/mL, na condição de normóxia, e $3,3 \times 10^{11}$ partículas/mL, na condição de hipóxia, não apresentando diferença significativa nas diferentes tensões de oxigênio. Enquanto as EV-AT-MSC apresentaram média de aproximadamente $1,7 \times 10^{11}$ partícula/mL em normóxia, e $1,1 \times 10^{11}$ partícula/mL em hipóxia, também não apresentando diferença significativa na concentração de partículas nas diferentes tensões de oxigênio. No entanto, as UC-MSC liberaram duas vezes mais vesículas extracelulares do que as AT-MSC. Esse resultado pode ser explicado pelo fato das células estromais mesenquimais provenientes de tecidos fetais, como as UC-MSC, serem células provenientes de um período precoce do desenvolvimento e apresentam maior potencial proliferativo, clonogênico e plasticidade, além de menor tempo necessário à duplicação celular em relação às células de tecidos adultos,

consequentemente, secretam uma quantidade maior de vesículas para o meio extracelular (BAKSH; YAO; TUAN, 2007).

Em relação à expressão de marcadores específicos de EV, as EV-UC-MSC e as EV-AT-MSC apresentaram fraca expressão das proteínas transmembrana CD9 (22 kDa), CD 63 (26 kDa), e da proteína citosólica Alix (95 kDa). A ausência do citocromo c (14 kDa) nas EV e a presença nas células indicou ausência ou baixos níveis de contaminação com *debris* celulares e outras vesículas de origem não-endossomal. Portanto, as vesículas extracelulares derivadas das células mesenquimais do cordão umbilical e do tecido adiposo apresentaram a expressão de proteínas indicada para exossomos, em ambas as tensões de oxigênio (LOTVALL *et al.* 2014).

Para avaliar a atividade de imunossupressão das EV derivadas das células mesenquimais, cultivadas nas condições de normóxia e hipóxia, foram realizadas a avaliação da expressão gênica, potencial de imunorregulação e interação com as células-alvo.

Quando avaliados a expressão de genes envolvidos na imunorregulação, foi possível observar que as moléculas *LGALS1* e *PGE2* foram expressas nas MSC e nas suas respectivas vesículas extracelulares. A *LGALS1* foi significativamente mais expressa nas EV-MCU e nas EV-AT-MSC em comparação com as MSC respectivas. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da galectina-1 ser constitutivamente expressa e liberada para o meio de culturas das MSC (KADRI *et al.*, 2005). As *PGE2* também são constitutivamente expressas por MSC, embora a sua expressão aumente em um ambiente inflamatório (AGGARWAL, PITTENGER, 2005), podendo justificar a baixa expressão encontrada nas MSC e EV. A molécula *IDO* apresentou baixa expressão nas células e não apresentou expressão nas vesículas extracelulares, pois IDO não é expressa constitutivamente por MSC, mas possui a transcrição aumentada após o estímulo de citocinas inflamatórias, principalmente por IFN- γ (MEISEL *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram a capacidade dos exossomos em estabelecer comunicação com as células vizinhas a partir da entrega de RNA (LÖTVALL; VALADI, 2007). De acordo com Mittelbrunn *et al.* (2011), as células T ativadas podem transferir de forma direta e unidirecional miRNA para células apresentadoras de antígenos (APC) através de uma sinapse imune mediada pelo transporte exossomal. Do mesmo modo, Lötvall e Valadi (2007) demonstraram que os mRNA contidos dentro dos exossomos podem ser transcritos em cDNA ou traduzidos na célula receptora. Estas

características proporcionam aos exossomos um potencial importante para influenciar a expressão de genes em células alvo.

Com o intuito de avaliar o efeito imunomodulatório que as EV exercem na proliferação de linfócitos T foram utilizadas diferentes concentrações das EV (50 µg, 100 µg e 150 µg). Os resultados encontrados indicam que as EV foram capazes de inibir a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4⁺ em aproximadamente 3 vezes e de linfócitos T CD8⁺ em aproximadamente 2 vezes. No entanto, observamos que as MSC possuem uma maior capacidade de diminuir a proliferação de linfócitos T alogênicos em relação ao uso isolado de EV, pois a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4⁺ foi aproximadamente 8 vezes menor e de linfócitos T CD8⁺ foi aproximadamente 6 vezes menor quando cultivadas na presença de MSC.

Dados similares foram descritos por Conforti et al. (2014) que isolaram por ultracentrifugação microvesículas derivadas de MO-MSC e observaram que estas não foram tão eficazes quanto às próprias células na capacidade de modular respostas imunes *in vitro*. Chen et al. (2016) isolaram exossomos derivados de MO-MSC utilizando o kit comercial ExoQuick e observaram que estes suprimiram a secreção dos fatores pró-inflamatórios TNF-α e IL-1β, e aumentou a concentração do fator anti-inflamatório TGF-β durante a cultura *in vitro*. Além disso, os exossomos induziram a conversão das células T *helper* tipo 1 (Th1) em células T *helper* tipo 2 (Th2), reduziram o potencial das células T se diferenciarem em Th17, aumentaram os níveis de células T reguladoras (Treg) e de linfócitos T citotóxico associado à proteína 4, sugerindo que os exossomos possuem as propriedades imunomoduladoras.

Ao contrário, Gouveia et al. (2015) isolaram EV derivadas de MO-MSC e AT-MSC utilizando ultracentrifugação com 30% de sacarose e relatou que as EV-MSC não inibiram a proliferação de linfócitos em níveis de dose até 100 µg/mL, sugerindo que o contato célula-célula desempenha um papel importante sobre o potencial imunossupressor mediado por MSC. Os achados contraditórios dos diferentes trabalhos podem estar associados aos diferentes métodos de isolamento e purificação de EV, a fonte de MSC e os tipos de estímulos utilizados.

Funcionalmente, as EV podem interagir com suas células-alvo por meio de vários processos, incluindo: fusão com a membrana plasmática ou internalização através da endocitose, ambos seguidos pela liberação de seu conteúdo intraluminal no citosol, além da interação ligante-receptor, para modular as vias de sinalização intracelular. A captação das EV pode ser visualizada

diretamente. O método mais comum para detectar essa captação envolve o uso de corantes de membrana lipídica fluorescentes para colorir as membranas das EV, com o PKH26 (MULCAHY *et al.*, 2014).

O PKH26 é um corante, altamente fluorescente, usados para marcar membranas artificiais e biológicas. A cauda alifática do corante intercala na bicamada lipídica e forma fortes interações não covalentes, promovendo assim a retenção do corante a longo prazo com fluorescência estável (PROGATZKY *et al.*, 2013). As vesículas extracelulares possuem componentes da membrana celular adquiridos durante sua formação, portanto esse marcador liga-se a sua membrana e pode ser avaliado por microscopia confocal.

O resultado da microscopia confocal mostraram que a maioria EV-MSC são captadas pelas células-alvo e foram reunidas ao redor da região perinuclear. É importante ressaltar que não houve sinais fluorescentes na membrana plasmática indicando que EV podem ter sido internalizadas nas células por meio de endocitose. Se a fusão fosse a via dominante para a captação das EV, a membrana plasmática conteria sinal fluorescente após a co-cultura de células e EV marcados. No entanto, estudos demonstraram que as EV podem ser internalizados por mais de uma rota (MULCAHY *et al.*, 2014).

Resultados semelhantes foram observados na internalização de exossomos por células foliculares (SOHEL *et al.*, 2013) e células imunes (MITTELBRUNN *et al.*, 2011). As imagens da microscopia confocal revelaram partículas fluorescentes de tamanhos e intensidades de fluorescência heterogêneos, entre as diferentes fontes de vesículas extracelulares e o pré-condicionadas por hipóxia, podendo indicar que o tempo de ação está relacionado com esses parâmetros, afetando a escolha da fonte e pré-tratamento para obtenção de resultados terapêuticos diferentes para cada doença. Gonzalez-King e colaboradores demonstraram que MSC com superexpressão de HIF-1 α secretam maiores quantidades de exossomos em comparação com MSC de controle, que apresentaram capacidade angiogênica elevada e podem ser aplicados ao tratamento de doenças relacionadas à isquemia (GONZALEZ-KING *et al.*, 2017)

Visto que, evidências sugerem que a MSC pode mediar seu impacto terapêutico benéfico por meio de EV, estas podem superar as limitações do uso de células como: senescência induzida pela cultura, rejeição mediada por imunidade, instabilidade genética, perda de propriedades funcionais, dentre outras (NAWAZ *et*

al., 2016). Além disso, o sobrenadante da cultura de MSC, fonte das EV, sempre é descartado, com isso altas concentrações de vesículas são perdidas na rotina laboratorial.

Estudos clínicos envolvendo infusão de MSC para tratar GvHD aguda corticorrefrátaria demonstraram que aproximadamente 50% dos pacientes apresentaram melhora clínica entre 18 e 28 dias após a infusão e apenas 4,3% apresentaram efeitos secundários agudos, sendo que a severidade do GvHD influencia nas taxas de respostas. Os pacientes receberam uma mediana de 3 infusões de 4×10^6 células/kg em um intervalo médio de 25 dias, porém o tratamento teve início 25 dias após o diagnóstico de GvHD, e infusões anteriores estariam associadas com melhores resultados (DOTOLI et al., 2017). Portanto, ainda é necessário desenvolver novas ferramentas para controlar a doença e melhorar a resposta clínica dos pacientes.

Em um estudo de caso, Kordelas et al. (2014) tratou paciente GvHD refratário com uma fração enriquecida de exossomos processada a partir de sobrenadantes de MSC. As EV foram isoladas utilizando precipitação por polietilenoglicol (PEG) e ultracentrifugação, seguido de análise do conteúdo de citocinas anti e pró-inflamatórias. Após 4 doses de EV-MSC, a GvHD cutânea e mucosa apresentou uma resposta muito promissora, diminuindo as citocinas pró-inflamatórias, permitindo reduzir quatro vezes a dose administrada de esteroides. O tratamento baseado em EV teve efeitos benéficos para o paciente sem efeitos secundários.

Portanto, a fim de desenvolver uma imunoterapia eficaz e bem sucedida baseada em EV é necessário esclarecer os seus mecanismos de ações, normalizar os protocolos de expansão, isolamento e caracterização, além de avaliar métodos para aumentar o seu potencial de imunorregulação e melhorar a resposta terapêutica.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que o protocolo desenvolvido para depleção das vesículas extracelulares do soro AB humano é adequado para a produção de células estromais mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical, pois não alterou a morfologia, perfil imunofenotípico, viabilidade e diferenciação das células. O cultivo em condições livres de xenoantígenos está sendo amplamente utilizado na terapia celular, visando evitar a contaminação com patógenos animais que causam reações imunes nos pacientes, e o seu uso de forma depletado de EV é importante para a caracterização físico-química, avaliação do potencial terapêutico e a definição de um possível modo de ação para futuras aplicações clínicas das vesículas extracelulares derivadas das células mesenquimais. Tal estratégia de cultivo permitiu isolar, a partir do sobrenadante, vesículas extracelulares derivadas das UC-MSC e AT-MSC, cultivadas em condições de normóxia e hipóxia, e caracterizá-las com o perfil de exossomos em relação ao tamanho e expressão de proteínas. As EV-UC-MSC e EV-AT-MSC apresentaram expressão de genes envolvidos na imunomodulação e foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos T.

Referências

7 REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p.1815-1822, 2005.

BAGNO, L. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: progress and challenges. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 7, p. 1610-1623, 2018.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R. S. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. **Stem Cells**, v. 25, n. 6, p.1384-1392, 2007.

BEEGLE, Julie *et al.* Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stromal Cells Induces Metabolic Changes, Enhances Survival, and Promotes Cell Retention In Vivo. **Stem Cells**, v. 33, n. 6, p. 1818-1828, 2015.

BIEBACK, K. *et al.* Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p.2331-2341, 2009.

BIEBACK, K.; KINZEBACH, S.; KARAGIANNI, M. Translating Research into Clinical Scale Manufacturing of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells International**, v. 2010, p.193519, 2011.

BIEBACK, Karen. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 326-335, 2013.

BLANC, K. L.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 383-396, 2012.
BÖRGER, Verena *et al.* Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1450-1452, 2017.

BOURIN, P.; BUNNELL B.A.; CASTEILLA L.; DOMINICI M.; KATZ A.J.; MARCH K.L. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytotherapy**, v.15, n.6, p.641-648, 2013.

BURRELLO, J. *et al.* Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Immune-Modulation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, 2016.

CÁNOVAS, D.; BIRD, N. Human AB serum as an alternative to fetal bovine serum for endothelial and cancer cell culture. **Altex**, v. 29, n. 4, p.426-428, 2012.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p.641-650, 1991.

CHEN, W. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. **Immunologic Research**, v. 64, n. 4, p.831-840, 2016.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p.255-289, 2014.

CONFORTI, A. et al. 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 and Development**, v. 23, n. 21, p.2591-2599, 2014.

COVAS, D.T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 9, p.1179-1183, 2003.

CRISAN, M. et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p.301-313, 2008.

D'ASTI, E. et al. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. **Frontiers in Physiology**, v. 3, 2012

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315-317, 2006.

DOS SANTOS, F. et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. **Journal Of Cellular Physiology**, 2010.

DOS SANTOS, V. T. M. et al. Characterization of Human AB Serum for Mesenchymal Stromal Cell Expansion. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 11-21, 2016.

DOTOLI, G M et al. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, p.1-4, 2017.

EITAN, E. et al. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. **Journal Of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, 2015.

ENNIS, J.; GÖTHERSTRÖM, C.; LE BLANC, K.; DAVIES, J.E. In vitro immunologic properties of human umbilical cord perivascular cells. **Cytotherapy**, v.10, n.2, p. 174-81, 2008.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Hematology**, v. 109, n. 1, p.235-242, 2000.

FEKETE, N. *et al.* 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 components. **Cytotherapy**, v. 14, n. 5, p. 540-554, 2012.

FERRARA, J.L.M.; LEVINE, J. E.; REDDY, P.; HOLLER, E. Graft-versus-Host Disease. **The Lancet**. v.373, n.9674, p.1550-1561, 2009.

FORRAZ, N.; MCGUCKIN, C. P. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. **Cell Proliferation**, v. 44, p. 60-69, 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, p. 267-274, 1976.

GANGODA, L. *et al.* Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic?. **Proteomics**, v. 15, n. 2-3, p.260-271, 2014.

GIESEKE, F. *et al.* Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. **Blood**, v. 116, n. 19, p.3770-3779, 2010.

GONZALEZ-KING, H. *et al.* Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. **Stem Cells**, v. 35, n. 7, p. 1747-1759, 2017.

GOUVEIA DE ANDRADE, A. V. *et al.* Extracellular vesicles secreted by bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells fail to suppress lymphocyte proliferation. **Stem Cells And Development**, v. 24, n. 11, p.1374-1376, 2015.

HAQUE, N. *et al.* Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

HASS, R.; KASPER, C.; BÖHM, S.; JACOBS, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived msc. **Cell Communication And Signaling**, v. 9, n. 1, 2011.

HELDLING, Nina *et al.* Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 8, p. 506-517, 2015.

HORWITZ, E.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, p.393-5, 2005.

HU, C.; LI, L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1428-1442, 2018.

JOCHEMS, C. E. *et al.* The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?. **Alternatives to Laboratory animals**, v.30, n.2, p.219-227, 2002.

KADRI, T. *et al.* Proteomic Study of Galectin-1 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 14, n. 2, p.204-212, 2005.

KORDELAS, L *et al.* MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. **Leukemia**, v.28, n.4, p. 970-973 2014.

KRAMPERA, M. *et al.* Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p.386-398, 2006.

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

LE BLANC, K. *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **The Lancet**, v. 363, n. 9419, p.1439-1441, 2004.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p.383-396, 2012.

LIEW, L. C. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. **International Immunology**, v. 29, n. 1, p. 11-19, 2017.

LÖTVALL, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p.26913-26919, 2014.

LÖTVALL, Jan; VALADI, Hadi. Cell to Cell Signaling via Exosomes Through esRNA. **Cell Adhesion & Migration**, v. 1, n. 3, p. 156-158, 2007.

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

MITTELBRUNN, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature Communications**, v. 2, p.282, 2011.

MITTELBRUNN, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

MULCAHY, Laura Ann *et al.* Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal Of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

NAJAR, Mehdi *et al.* Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 160-171, 2016.

NAVA, M. M.; RAIMONDI, M. T.; PIETRABISSA, R. Controlling Self-Renewal and Differentiation of Stem Cells via Mechanical Cues. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

NAWAZ, M. *et al.* Extracellular vesicles: evolving factors in stem cell biology. **Stem Cells International**, v.2016:1073140, 2016.

OWEN, A.; NEWSOME, P. N. Mesenchymal stromal cell therapy in liver disease: opportunities and lessons to be learnt?. **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 309, n. 10, p. 791-800, 2015.

PACHLER, K. *et al.* A Good Manufacturing Practice-grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles. **Cytotherapy**, v. 19, n. 4, p. 458-472, 2017.

PAREKKADAN, Biju; MILWID, Jack M. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 87-117, 2010.

PHINNEY, D. G.; PITTENGER, M. F. Concise Review: msc-derived exosomes for cell-free therapy. **Stem Cells**, v. 35, n. 4, p. 851-858, 2017.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POLTAVTSEVA, R. A. *et al.* Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp: Isolation, Characteristics, and Potencies of Targeted Differentiation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 158, n. 1, p.164-169, 2014.

PROGATZKY, F. *et al.* From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. **Interface Focus**, v. 3, n. 3, 2013.

PYTLÍK, R. *et al.* The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 20, p. 3415-3427, 2009.

RANI, S. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 5, p.812-823, 2015.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p.373-383, 2013.

SAKATA, D.; YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2, an Immunoactivator. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 112, n. 1, p.1-5, 2010.

SAPAROV, A. *et al.* Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

SHELKE, Ganesh Vilas *et al.* Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal Of Extracellular Vesicles**, eitr. 3, n. 1, 2014.

SHI, Y. *et al.* How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends In Immunology**, v. 33, n. 3, p. 136-143, 2012.

SOHEL, M. M. H. *et al.* Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013.

TEKKATTE, C. *et al.* "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. **Stem Cells International**, v. 2011, p.1-14, 2011.

THÉRY, C. *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols In Cell Biology**, cap. 3, unit. 3.22, p.1-29, 2006.

WITWER, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p.20360, 2013.

YAGHOUBI, Y. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. **Life Sciences**, v. 233, 2019.

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

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p.27066-27126, 2015.

ZHANG, B. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Secrete Immunologically Active Exosomes. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 11, p.1233-1244, 2014.

ZHAO, L. *et al.* Preconditioning is an effective strategy for improving the efficiency of mesenchymal stem cells in kidney transplantation. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, 2020.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n.2, p.:211–228, 2001.