**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUCAS EDUARDO BOTELHO DE SOUZA

**Geração de organoides vascularizados como veículos produtores
do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A**

RIBEIRÃO PRETO
2016

LUCAS EDUARDO BOTELHO DE SOUZA

**Geração de organoides vascularizados como veículos produtores
do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A**

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

Programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e
Terapia Celular

Opção: Células-Tronco e Terapia Celular

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

RIBEIRÃO PRETO

2016

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.

Souza, Lucas Eduardo Botelho de

Geração de organoides vascularizados como veículos produtores do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A. Ribeirão Preto, 2016.

117 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular. Opção: Células-Tronco e Terapia Celular

Orientador: Tadeu Covas, Dimas.

1. Hemofilia A 2. Fator VIII 3. Células endoteliais 4. Células estromais do tecido adiposo 5. Nicho perivascular.

Nome: SOUZA, Lucas Eduardo Botelho de

Título: Geração de organoides vascularizados como veículos produtores do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Donizeti e Marlene, meus exemplos, cuja grandeza do amor, da compreensão e do apoio que recebo não caberia nem em mil teses.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais *Donizeti* e *Marlene* e meu irmão *Júlio*, pela convivência amorosa, pela cumplicidade e pelo apoio.

À minha amada *Lilian Rosa*, por ouvir, compreender e me apoiar sempre. Pela cor dos meus dias e por todas as consultorias sobre química para este trabalho.

À todos os meus *professores*, por todos os ensinamentos que carrego.

Ao *Prof. Dimas Tadeu Covas*, pela orientação durante a realização deste trabalho, pela compreensão e confiança, e pelas oportunidades valiosas que me concedeu.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde este trabalho foi desenvolvido. Muito obrigado *Daianne, Rafaela, Raquel, Ricardo* e *Thaís* pela amizade, pelo companheirismo, pela ajuda e pela convivência leve, descontraída e enriquecedora.

À *Fernanda Ursoli*, por sua valiosa amizade e companheirismo, pelo apoio constante e pelas incontáveis ajudas no desenvolvimento desse trabalho.

À *Daianne Carvalho*, pela amizade valiosa, pelo companheirismo e pela ajuda imprescindível com os ensaios cromogênicos e de titulação viral e por ceder algumas de suas linhagens celulares para os experimentos finais.

À *Marcela Freitas*, pela amizade e pelo auxílio com a produção dos vírions usados neste trabalho.

À *Virgínia Picanço*, pelos ótimos conselhos e sugestões durante a realização deste trabalho.

À *Cleide Silva*, pela paciência e os valiosos ensinamentos sobre experimentação animal, que foram absolutamente imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À todos os *funcionários do Laboratório para Estudos Experimentais em Animais*, por serem tão prestativos durante o fornecimento dos animais e por proverem excelentes condições para os ensaios de experimentação animal.

À *Patrícia Vianna* e *Camila Menezes*, pelos ensinamentos e pelo suporte essencial durante as análises de citometria de fluxo.

À *Danielle Magalhães* e à *Josiane Serrano*, pela amizade e por me auxiliarem nos experimentos envolvendo imunofluorescência e colorações histológicas.

À *Lays Sobral*, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo suporte durante a marcação de células endoteliais por imunofluorescência.

À *Simone Haddad* e à *Maristella Orellana*, por me abrirem as portas de seus laboratórios, pelo apoio e pelas sugestões durante a realização dos experimentos.

À todos os *funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto*, pela convivência harmoniosa e por proverem excelentes condições para o desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

À *Adriana Fuzaro*, secretária do programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, pela paciência e por me auxiliar nos procedimentos burocráticos ao longo do doutorado.

Aos amigos do Hemocentro de Ribeirão Preto, *Aline, Amanda, Angelo, Everton, João, Júlia, Lucas, Luciana, Luciano* e *Luíza* e pelo companheirismo, pela convivência leve, pelo apoio e pela ajuda em diversos momentos.

EPÍGRAFE

“A verdade é sempre um abismo. Deve-se – como em uma piscina – se atrever a mergulhar do trampolim trêmulo das experiências cotidianas triviais e submergir nas profundezas, para então subir novamente, rindo e lutando para respirar, até a superfície que agora torna-se duplamente iluminada.”

Franz Kafka

RESUMO

Souza, L. E. B. **Geração de organoides vascularizados como veículos produtores do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A.** 2016. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A hemofilia A (HA) é uma doença hemorrágica causada por mutações que levam à deficiência na produção ou função do fator VIII da coagulação (FVIII). O desafio atual é estabelecer uma terapia profilática e duradoura capaz de assegurar níveis plasmáticos de FVIII suficientes para corrigir o fenótipo da HA. Uma das estratégias é modificar células *ex vivo* para expressar o FVIII e transplantá-las para que secretem a referida proteína *in vivo*. No entanto, esta abordagem tem sido limitada pela sobrevida curta das células transplantadas. Neste trabalho, hipotetizamos que células endoteliais vasculares da veia do cordão umbilical (HUVECs) e células progenitoras perivasculares como as células estromais do tecido adiposo (ADSCs) poderiam ser co-transplantadas para formar organoides vascularizados que serviriam como veículos produtores de FVIII *in vivo*. Para isso, primeiramente investigamos o potencial do meio para crescimento de células endoteliais (EGM-2) contendo fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das propriedades progenitoras e pró-angiogênicas das ADSCs após cultivo. Para tanto, primeiramente comparamos o efeito de formulações de meios convencionais (DMEM + 10% de soro fetal bovino [DMEM] e α MEM + 15% de SFB [α MEM]) e do EGM-2 na eficiência clonogênica, proliferação e diferenciação *in vitro* das ADSCs. ADSCs cultivadas em EGM-2 (ADSC-EGM) apresentaram a maior eficiência clonogênica, maior potencial proliferativo e maior capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, seguidas pelas ADSC- α MEM e pelas ADSC-DMEM, respectivamente. Em seguida, investigamos o potencial das ADSC-EGM e ADSC- α MEM em dar suporte à sobrevida das HUVECs e de estimular a angiogênese. Para isso, modificamos HUVECs para expressar a proteína repórter bioluminescente luciferase 2 e utilizamos o sinal bioluminescente para monitorar a sobrevida das mesmas. Após co-cultivo em meio reduzido de fatores de crescimento, apenas as ADSC-EGM atenuaram a apoptose das HUVEC^{luc}, sendo que a sobrevida das HUVEC^{luc} foi diretamente proporcional à quantidade de ADSC-EGM nos co-cultivos. Além disso, apenas as ADSC-EGM estimularam a formação de cordões endoteliais pelas HUVEC^{luc} durante o co-cultivo sob privação de fatores de crescimento. Notadamente, a extensão e ramificação da rede de cordões endoteliais formada foi diretamente proporcional à quantidade de ADSC-EGM. Estes efeitos anti-apoptótico e pró-angiogênico das ADSC-EGM foram recapitulados quando utilizamos apenas o meio condicionado das ADSC-EGM, indicando que o secretoma das ADSCs é alterado após cultivo em EGM-2. Em seguida, ADSCs e HUVEC^{luc} foram co-transplantadas subcutaneamente em camundongos imunodeficientes e a sobrevida das HUVEC^{luc} foi avaliada pela quantificação da bioluminescência. Após 60 dias, a quantidade de HUVEC^{luc} vivas foi equivalente entre aquelas transplantadas sozinhas ou com ADSC- α MEM (15,0%±0,7% vs 13,0%±0,5%, respectivamente). Entretanto, a sobrevida das HUVEC^{luc} co-transplantadas com ADSC-EGM atingiu 105%±3,5%. Análises histológicas demonstraram que os organoides gerados pela co-infusão de HUVEC^{luc} e ADSC-EGM apresentaram maior densidade vascular e os vasos sanguíneos eram funcionais, a julgar pela presença de eritrócitos em seus lúmens. Em seguida, as ADSC-EGM e HUVECs foram modificadas para expressar o FVIII humano com o domínio B parcialmente deletado e transplantadas subcutaneamente em camundongos hemofílicos A imunodeficientes, os quais foram gerados após o cruzamento de machos NSG com fêmeas hemofílicas. Em todas as tentativas de transplante não houve aumento na atividade biológica do FVIII no plasma dos animais.

Para avaliar se a rota de infusão estava influenciando a distribuição do FVIII na circulação, transplantamos células de adenocarcinoma hepático SK-HEP expressando FVIII e luciferase pelas vias subcutânea e intra-hepática. Após 8 dias, apenas os animais que receberam o transplante intra-hepático apresentaram uma atividade biológica do FVIII no plasma superior a 0,5 UI/mL. Após 15 dias, a atividade detectada foi pelo menos de 1 UI/mL, ao passo que os animais transplantados subcutaneamente não apresentavam níveis detectáveis de FVIII no plasma. Utilizando dados de bioluminescência, observamos que as células transplantadas subcutaneamente ou no fígado apresentavam a mesma velocidade de crescimento. Em suma, nossos dados demonstram que o cultivo das ADSCs em um microambiente pró-angiogênico aumenta sua eficiência clonogênica, sua capacidade de diferenciação *in vitro* e seu potencial em promover a sobrevivência de células endoteliais e estimular a angiogênese *in vivo* em comparação com estratégias de cultivo convencionais. Estas observações abrem caminho para a identificação de moléculas importantes na regulação da multipotência e da atividade pró-angiogênica das ADSCs. Além disso, nossos achados estabelecem uma estratégia capaz de aumentar a eficiência terapêutica das ADSCs contra doenças isquêmicas e de elevar a sobrevivência de células endoteliais co-transplantadas para servir como veículo produtor de proteínas terapêuticas *in vivo*. Por fim, concluímos que o local de implante das células expressando FVIII é crítico para a eficiência terapêutica deste tipo de terapia celular para a correção da HA.

Palavras-chave: Hemofilia A, fator VIII, células endoteliais, células estromais do tecido adiposo, nicho perivascular.

ABSTRACT

Souza, L. E. B. **Generation of vascularized organoids as vehicles for production of coagulation factor VIII in a mouse model of hemophilia A.** 2016. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Hemophilia A (HA) is a hemorrhagic disorder caused by a defective production or function of the coagulation factor VIII (FVIII). One of the frontiers in HA treatment is to establish a long-lasting prophylactic therapy to provide sufficient plasma levels of FVIII to correct the bleeding phenotype. One of the strategies to accomplish this is to modify cells *ex vivo* to express FVIII and transplant them to secrete the therapeutic protein *in vivo*. However, this approach has been limited by the poor survival of the transplanted cells. In this work, we hypothesized that the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and perivascular progenitor cells such as the adipose-derived stromal cells (ADSCs) could be co-transplanted to form vascularized organoids which could serve as vehicles for FVIII production *in vivo*. For this, we initially investigated the potential of endothelial cell growth medium (EGM-2) containing pro-angiogenic growth factors on the maintenance of progenitor and pro-angiogenic properties of ADSCs after culture. To this end, we first compared the effect of conventional media formulations (DMEM + 10% fetal bovine serum [DMEM], and α MEM + 15% FBS [α MEM]) and EGM-2 on the clonogenic efficiency, proliferation and *in vitro* differentiation of ADSCs. ADSCs cultured in EGM-2 (ADSC-EGM) presented the highest clonogenic efficiency, proliferative potential and adipogenic and osteogenic differentiation abilities, followed by the ADSCs cultured in α MEM (ADSC- α MEM) and in DMEM (ADSC-DMEM), respectively. Next, we investigated the potential of ADSC-EGM and ADSC- α MEM to support the survival of HUVECs and to promote angiogenesis. For this purpose, HUVECs were modified to express the bioluminescent enzyme luciferase 2 and the bioluminescent signal was used to monitor cell survival. After co-culture in a growth factor reduced medium (*i.e.* α MEM+1% FBS), only the ADSC-EGM attenuated HUVEC^{luc} apoptosis, and the survival of HUVEC^{luc} was directly proportional to the amount of ADSC-EGM seeded. Furthermore, only the ADSC-EGM were able to stimulate the formation of endothelial cords by HUVEC^{luc} during co-culture under growth factor starvation. Notably, the length and branching of the endothelial cords were directly proportional to the amount of ADSC-EGM in the co-cultures. These anti-apoptotic and pro-angiogenic effects of ADSC-EGM were recapitulated by the ADSC-EGM conditioned medium, indicating that the secretome of the ADSCs is altered upon culture in EGM-2. Next, HUVEC^{luc} and ADSCs were co-transplanted subcutaneously into immunodeficient mice and the survival of HUVEC^{luc} was monitored by bioluminescent imaging. After 60 days the amount of living HUVEC^{luc} was equivalent between those transplanted with HUVEC^{luc} alone and those co-transplanted with HUVEC^{luc} and ADSC- α MEM (15.0% $\pm$ 0.7% vs. 13.0% $\pm$ 0.5%, respectively). However, the survival of HUVEC^{luc} co-transplanted with ADSC-EGM reached 105.0% $\pm$ 3.5%. Histological analysis showed that the organoids generated by the co-transplantation of HUVEC^{luc} and ADSC-EGM had the higher vascular density and that the blood vessels formed were functional, as indicated by the presence of erythrocytes within their lumens. Next, the ADSC-EGM and HUVECs were engineered to express human FVIII with the B-domain partially deleted and were transplanted subcutaneously in immunodeficient hemophilic A mice, which were generated after crossing NSG males with hemophilic A females. All attempts of transplantation did not result in any increase of the biological activity of FVIII in the plasma of the animals. To evaluate whether the site of transplantation was influencing the distribution of FVIII to the circulation, we

transplanted liver adenocarcinoma SK-HEP cells expressing both FVIII and luciferase 2 by subcutaneous and intrahepatic injections. After 8 days, the animals receiving the intrahepatic injections displayed plasma levels of FVIII above 0.5 IU/mL. After 15 days, the FVIII levels increased to at least 1.0 IU/mL. In a sharp contrast, animals that received subcutaneous injections showed no increase in the plasmatic levels of FVIII. Using bioluminescence quantification, we observed that the cells transplanted subcutaneously or intrahepatically showed similar growth rates *in vivo*. Collectively, these findings demonstrate that the cultivation of the ADSCs in a pro-angiogenic milieu increases their clonogenic efficiency, *in vitro* differentiation capacity and their potential to promote survival of endothelial cells and stimulate angiogenesis *in vivo*. These findings lay the groundwork for identifying key modulators of ADSCs multipotency and pro-angiogenic properties. Moreover, our pre-conditioning strategy may be explored as a strategy to increase the therapeutic efficiency of ADSCs against ischemic diseases and to increase the survival of co-transplanted endothelial cells to serve as a vehicle for delivering therapeutic proteins *in vivo*. Finally, we conclude that the implantation site of FVIII-expressing cells is crucial to achieve the correction of HA.

Keywords: Hemophilia A, factor VIII, endothelial cells, adipose-derived stromal cells, perivascular niche.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADIPOQ	Do inglês, <i>adiponectin</i> (adiponectina)
ADSC	Do inglês, <i>adipose-derived stromal/stem cells</i> (células tronco/estromais do tecido adiposo)
ADSC-EGM	ADSCs cultivadas em EGM-2
ADSC-αMEM	ADSCs cultivadas em αMEM
ANOVA	Do inglês, <i>analysis of variance</i> (análise de variância)
AT	Antitrombina
BCL-2	Do inglês, <i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i> (proteína associada à leucemia linfóide crônica de células B e linfoma-2)
BGLAP	Do inglês, <i>bone gamma-carboxyglutamate protein</i> (proteína gama-carboxiglutamato óssea / osteocalcina)
BSA	Do inglês, <i>bovine serum albumin</i> (albumina bovina sérica)
CEBPa	Do inglês, <i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i> (proteína ligante de CCAAT/enhancer alfa)
CEV	Células endoteliais vasculares do tecido adiposo
CFU-F	Do inglês, <i>colony forming units-fibroblastic</i> (unidades formadoras de colônias fibroblásticas)
CHO	Do inglês, <i>chinese hamster ovarian cells</i> (células de ovário de hamster chinês)
CMV	Citomegalovírus humano
CONITEC	Comissão Nacional para Incorporação de Tecnologias no SUS
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (meio Eagle modificado de Dulbecco)
ECM	Do inglês, <i>endothelial cell medium</i> (meio para células endoteliais)
EDTA	Do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGF	Do inglês, <i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidérmico)
EGM-2	Do inglês, <i>endothelial growth medium-2</i> (meio para crescimento de células endoteliais-2)
EGM-MC	Meio condicionado de ADSCs cultivadas em EGM
FABP4	Do inglês, <i>fatty acid binding protein-4</i> (proteína ligante de ácido graxo-4)
FEV	Fração estromal vascular

FGF-2	Do inglês, <i>fibroblast growth factor-2</i> (fator de crescimento de fibroblastos-2)
FITC	Do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
FV, FVII, FVIII, FIX e FX	Fatores V, VII, VIII, IX e X da coagulação
FVIII_{dp}	Fator VIII derivado/isolado do plasma
FVIII_r	Fator VIII recombinante
GAPDH	Do inglês, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
GFP	Do inglês, <i>green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
HEK	Do inglês, <i>human embryonic kidney</i> (rim embrionário humano)
HEPES	Do inglês, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico]
HIV	Do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HUVECs	Do inglês, <i>human umbilical vein endothelial cells</i> (células endoteliais da veia do cordão umbilical humano)
IGF-1	Do inglês, <i>insulin-like growth factor-1</i> (fator de crescimento similar à insulina-1)
IgG	Imunoglobulina
IP	Iodeto de propídio
iPS	Do inglês, <i>induced pluripotent stem cells</i> (células-tronco de pluripotência induzida)
IRES	Do inglês, <i>internal ribosome entry site</i> (região interna para entrada do ribossomo)
ISAPS	Do inglês, <i>International Society of Aesthetic Plastic Surgery</i> (Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica e Estética)
IVIS	Do inglês, <i>in vivo imaging system</i> (sistema de processamento de imagem <i>in vivo</i>)
LEP	Leptina
LV	Lentivírus
MIF	Mediana da intensidade de fluorescência
MO-MSc	Células estromais mesenquimais multipotentes da medula óssea
MOI	Do inglês, <i>multiplicity of infection</i> (multiplicidade de infecção)
MRFC	Meio reduzido de fatores de crescimento (meio αMEM + 1% de SFB)

MSCV	Do inglês, <i>murine stem cell virus</i> (vírus de células-tronco murinas)
MT1-MPP	Do inglês, <i>membrane-type 1 matrix metalloproteinase</i> (metaloproteinase de matriz de membrana tipo 1)
NOD	Do inglês, <i>non-obese diabetic</i> (diabético não obeso)
NSG	NOD scid gamma (linhagem de camundongo)
PBS	Do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PC	Proteína C
PDGF	Do inglês, <i>platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PEI	Polietilenimina
PIBB	Processamento de imagem baseado em bioluminescência
PPARγ	Do inglês, <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i> (receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos)
PS	Proteína S
PVDF	Do inglês, <i>polyvinylidene fluoride</i> (fluoreto de polivinilideno)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio do instituto Memorial Roswell Park)
RUNX2	Do inglês, <i>Runt related transcription factor 2</i> (fator de transcrição relacionado à Runt-2)
SCID	Do inglês, <i>severe combined immunodeficiency</i> (síndrome da imunodeficiência severa combinada)
SFB	Soro fetal bovino
SK-HEP	Células de adenocarcinoma hepático humano
SPARC	Do inglês, <i>secreted protein acidic and cysteine rich</i> (proteína secretada ácida e rica em cisteína / osteonectina)
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura ambiente (25°C)
TERT	Do inglês, <i>telomerase reverse transcriptase</i> (transcriptase reversa telomerase)
TF	Do inglês, <i>tissue factor</i> (fator tecidual)
TFPI	Do inglês, <i>tissue factor protein inhibitor</i> (proteína inibidora do fator tecidual)

U	Unidade(s)
UA	Unidades arbitrárias
UI (FVIII)	Unidades internacionais
UI (vírus)	Unidades infectantes
URE	Unidades relativas de expressão
VAA s	Vírus adeno-associados
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento do endotélio vascular)
VWF	Do inglês, <i>von Willebrand factor</i> (fator de von Willebrand)
WFH	Do inglês, <i>World Federation of Hemophilia</i> (Federação Mundial da Hemofilia)
αMEM	Do inglês, <i>minimal essential medium - alpha</i> (meio mínimo essencial - alfa)
αMEM-MC	Meio condicionado de ADSCs cultivadas em αMEM
βACTN	Beta-actina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da cascata de coagulação. O fator tecidual (TF) liberado pelo endotélio danificado associa-se ao FVII e ativa-o	25
Figura 2: Comparação entre terapia gênica e terapia celular para a reposição de proteínas.	30
Figura 3: Composição celular da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo humano.	57
Figura 4: Processamento da FEV para obtenção de células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs).	59
Figura 5: Isolamento e caracterização de células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs).....	60
Figura 6: Caracterização das células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs).	60
Figura 7: Caracterização das células estromais do tecido adiposo (ADSCs).	62
Figura 8: Efeito do meio EGM-2 na eficiência clonogênica das ADSCs.	63
Figura 9: Efeito de diferentes meios de cultivo na proliferação das ADSCs.	64
Figura 10: Cultivo em meio EGM-2 aumenta o potencial de diferenciação <i>in vitro</i> das ADSCs.	65
Figura 11: Expressão gênica das ADSCs avaliada por qPCR.....	67
Figura 12: Análise de similaridade imunofenotípica entre ADSCs cultivadas em diferentes meios.	69
Figura 13: Bioluminescência <i>in vitro</i> das ADSCs modificadas para expressar luciferase.	70
Figura 14: Rastreamento das ADSC ^{luc} transplantadas <i>in vivo</i>	71
Figura 15: Identificação de HUVECs e células endoteliais murinas nos organóides.	72
Figura 16: ADSCs cultivadas em EGM-2 recuperam a expressão de CD34 após transplante.	73
Figura 17: Caracterização histológica dos organóides.	74
Figura 18: Organóides gerados após transplante de células da FEV em colágeno tipo I ou em Matrigel.	75
Figura 19: Avaliação por citometria de fluxo da apoptose de HUVECs após cultivo em meio reduzido de fatores de crescimento.	76
Figura 20: Bioluminescência das HUVEC ^{luc} <i>in vitro</i>	77
Figura 21: ADSC-EGM protegem as HUVEC ^{luc} contra morte celular causada por privação de fatores de crescimento.	78
Figura 22: O secretoma das ADSC-EGM protege as HUVEC ^{luc} contra a morte celular induzida por privação de fatores de crescimento.	79

Figura 23: ADSC-EGM estimulam a formação de cordões endoteliais durante co-cultivo com HUVEC ^{luc}	80
Figura 24: Identificação de ADSCs e HUVEC ^{luc} durante co-cultivo direto.	81
Figura 25: O secretoma das ADSC-EGM induz a formação de cordões endoteliais <i>in vitro</i>	82
Figura 26: ADSC-EGM aumentam a sobrevida das HUVEC ^{luc} após transplante.....	83
Figura 27: ADSC-EGM estimulam a angiogênese <i>in vivo</i>	84
Figura 28: Genotipagens realizadas durante o estabelecimento da linhagem de camundongos SCID/F8.	86
Figura 29: Caracterização fenotípica dos camundongos SCID/F8.....	87
Figura 30: Análise da fluorescência de ADSCs e HUVECs modificadas para expressar FVIII e GFP.	88
Figura 31: Caracterização das ADSC-EGM ^{FVIII-GFP} e HUVEC ^{FVIII-GFP} após sorting celular. ..	89
Figura 32: Suplementação das matrizes de colágeno com FGF-2 aumenta a sobrevida das HUVEC ^{luc} após privação de fatores de crescimento.....	90
Figura 33: Caracterização das células SK-HEP ^{FVIII-GFP-luc}	92
Figura 34: Rastreamento das células SK-HEP ^{FVIII-GFP-luc} <i>in vivo</i> por PIBB.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os cinco países com o maior número absoluto de hemofílicos.	26
Tabela 2: <i>Ranking</i> dos países com maior número de abdominoplastias e lipoaspirações realizadas em 2014.	33
Tabela 3: Primers utilizados para genotipagem durante a geração dos camundongos SCID/F8.	50
Tabela 4: Ciclo de temperaturas usadas na PCR para genotipagem dos alelos <i>F8</i> e <i>Prkdc</i>	51
Tabela 5: Meios mais utilizados para o cultivo de ADSCs.	62
Tabela 6: Expressão de moléculas de superfície em ADSCs cultivadas nos meios EGM-2, α MEM e DMEM..	67
Tabela 7: Dados dos transplantes de ADSC-EGM ^{FVIII-GFP} e HUVEC ^{FVIII-GFP} em camundongos SCID/F8.	91
Tabela 8: Atividade biológica do FVIII após transplante subcutâneo e intra-hepático de células SK-HEP ^{FVIII-GFP}	93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Mecanismo da hemostasia e as hemofilias	24
1.2. Tratamento atual da hemofilia A.....	26
1.3. Terapia gênica para a hemofilia	28
1.4. Terapia celular para a hemofilia	30
1.5. Células estromais do tecido adiposo (ADSCs)	32
2. OBJETIVO GERAL	36
2.1. Objetivos específicos.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Aspectos éticos e de biossegurança.....	38
3.2. Animais.....	38
3.3. Meios de cultivo e tampões	39
3.4. Amostras de tecido adiposo	40
3.5. Isolamento de células da fração estromal vascular do tecido adiposo (FEV)	40
3.6. Isolamento e cultivo das células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs)	41
3.7. Isolamento e cultivo das células estromais do tecido adiposo (ADSCs)	41
3.8. Quantificação de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F)	42
3.9. Avaliação do potencial proliferativo das ADSCs <i>in vitro</i>	42
3.10. Indução da adipogênese <i>in vitro</i>	42
3.11. Coloração com <i>oil red O</i> e quantificação da diferenciação adipogênica	42
3.12. Indução da osteogênese <i>in vitro</i>	43
3.13. Coloração com vermelho da alizarina e quantificação da diferenciação osteogênica	43
3.14. Avaliação da expressão gênica nas ADSCs por PCR quantitativo (qPCR)	44
3.15. Análise do perfil imunofenotípico das ADSCs e HUVECs	44
3.16. Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB)	44
3.17. Produção de vírions carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro	45
3.18. Titulação dos vírions carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro por PCR quantitativa (qPCR)	46
3.19. Geração de ADSCs e HUVECs expressando luciferase 2	46
3.20. Avaliação da apoptose de HUVECs por citometria de fluxo	46
3.21. Co-cultivo direto de ADSCs e HUVEC ^{luc}	47
3.22. Geração do meio condicionado de ADSC-αMEM (αMEM-MC) e de ADSC-EGM (EGM-MC).....	47

3.23. Efeito do meio condicionado das ADSCs na sobrevida das HUVEC ^{luc} perante a privação de fatores de crescimento.	48
3.24. Efeito do meio condicionado das ADSCs na formação de túbulos endoteliais <i>in vitro</i> pelas HUVEC ^{luc}	48
3.25. Preparação das matrizes de colágeno tipo I para transplante	48
3.26. Transplantes de ADSCs, HUVECs e células da FEV em camundongos NSG.....	49
3.26.1. Transplante subcutâneo de ADSCs e HUVECs em matriz de colágeno	49
3.26.2. Transplante subcutâneo de células da FEV em matriz de colágeno e Matrigel.....	49
3.27. Geração de camundongos hemofílicos A imunodeficientes (SCID/F8)	49
3.28. Genotipagem dos alelos de <i>F8</i> e <i>Prkdc</i>	50
3.29. Quantificação de linfócitos T e B no baço de camundongos SCID/F8 por citometria de fluxo.....	51
3.30. Produção de vírions carregadores do vetor lentiviral pCMV-FVIIIΔB-IRES-GFP.	51
3.31. Titulação dos vírions carregadores do vetor lentiviral pCMV-FVIIIΔB-IRES-GFP por citometria de fluxo	52
3.32. Geração de ADSCs e HUVECs expressando FVIII e GFP	52
3.33. Avaliação da matriz de colágeno suplementada com fibronectina e FGF-2 na sobrevida das HUVECs <i>in vitro</i>	52
3.34. Transplante de ADSC-EGM ^{FVIII-GFP} , HUVEC ^{FVIII-GFP} e SK-HEP ^{FVIII-GFP-luc}	53
3.35. Avaliação da atividade biológica do FVIII no plasma	53
3.36. Colorações de hematoxilina e eosina e sirius red	53
3.37. Imunofluorescência e microscopia confocal	54
3.38. Análises estatísticas	55
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Isolamento e caracterização da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo humano	57
4.2. As células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs) têm baixa capacidade proliferativa <i>in vitro</i>	58
4.3. Caracterização das células estromais do tecido adiposo (ADSCs).....	61
4.4. Cultivo em meio pró-angiogênico aumenta a eficiência clonogênica, a proliferação e a capacidade de diferenciação <i>in vitro</i> das ADSCs	62
4.5. O cultivo em EGM-2 aumenta a transcrição de genes que desencadeiam a adipogênese e osteogênese e não altera a transcrição do gene que codifica a telomerase	66
4.6. O meio de cultivo causa pequenas alterações no perfil imunofenotípico das ADSCs	67
4.7. ADSCs sobrevivem ao transplante subcutâneo em matrizes de colágeno tipo I..	69

4.8. Caracterização dos organoides gerados após o transplante de ADSCs e HUVECs	71
4.9. Matrizes de colágeno tipo I e Matrigel tem efeito oposto sobre a diferenciação adipogênica <i>in vivo</i>	74
4.10. Pré-cultivo em EGM-2 aumenta a capacidade das ADSCs de proteger HUVECs contra a morte celular causada por privação de fatores de crescimento.....	75
4.10.1. <i>Privação de fatores de crescimento como modelo para indução de morte celular em HUVECs.....</i>	76
4.10.2. <i>ADSCs pré-cultivadas em EGM-2 provêm maior proteção às HUVECs contra a morte celular induzida pela privação de fatores de crescimento</i>	77
4.10.3. <i>As ADSC-EGM induzem as HUVEC^{luc} a formar uma rede de cordões endoteliais <u>in vitro</u> perante a privação de fatores de crescimento.....</i>	79
4.11. O co-transplante de ADSC-EGM aumenta a sobrevivência das HUVEC ^{luc} <i>in vivo</i> e promove a angiogênese.....	82
4.12. Geração de uma linhagem de camundongos hemofílicos A imunodeficientes ...	85
4.13. Geração de ADSCs e HUVECs expressando o FVIII humano da coagulação	87
4.14. O co-transplante subcutâneo de ADSC-EGM ^{FVIII-GFP} e HUVEC ^{FVIII-GFP} é ineficaz para corrigir o fenótipo da hemofilia A em camundongos SCID/F8	89
4.15. A região onde as células produtoras de FVIII são transplantadas influencia a correção do fenótipo da hemofilia A.....	91
5. DISCUSSÃO	96
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mecanismo da hemostasia e as hemofilias

A hemostasia é definida como uma resposta fisiológica que ocorre após a danificação de vasos sanguíneos e o consequente sangramento. Esta resposta fisiológica é dividida em duas etapas: a primeira inicia-se logo após a lesão tecidual e é caracterizada pela contração vascular e a agregação de plaquetas para formar um tampão provisório para conter o sangramento. A etapa seguinte é iniciada pela liberação do fator tecidual (TF) e deflagra uma reação em cadeia em que os fatores da coagulação (F) são ativados sequencialmente até a conversão do fibrinogênio em fibrina, culminando na estabilização do coágulo. Esta reação em cadeia é conhecida como cascata da coagulação (**figura 1**).

A ativação da cascata de coagulação ocorre após a liberação do TF, o qual se associa ao FVII e ativa-o. Em seguida, o complexo formado pelo TF e o FVII ativado (FVIIa) catalisa a ativação dos FX e FIX. O FX ativado (FXa) associa-se ao FV ativado (FVa) para formar o complexo protrombinase e o FIX ativado (FIXa) associa-se ao FVIII ativado (FVIIIa) para formar o complexo tenase. Ambos os complexos convertem a protrombina (FII) em trombina (FIIa) que, por sua vez, convertem o fibrinogênio em fibrina. No entanto, a quantidade de fibrina produzida durante esta primeira ativação é cerca de 2% da quantidade necessária para estabilizar o plugue hemostático.¹ Portanto, o papel principal da via do TF é iniciar um processo referido como “explosão” da geração de trombina, por meio da qual a trombina ativa vários componentes da cascata de coagulação (como o FVIII) por retroalimentação positiva. Esta fase também é conhecida como propagação da cascata de coagulação (**figura 1**).¹

O mecanismo de coagulação é complexo e regulado em várias etapas por diversos inibidores, como a antitrombina (AT), as proteínas C (PC) e S (PS) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI). O papel destes elementos reguladores não será discutido, mas as etapas que eles regulam estão indicadas na **figura 1**.

fiFigura 1: Esquema da cascata de coagulação. O fator tecidual (TF) liberado pelo endotélio danificado associa-se ao FVII e ativa-o. Por sua vez, o complexo formado pelo TF e o FVII ativado (FVIIa) catalisa a ativação dos FX e FIX. O FX ativado (FXa) associa-se ao FV ativado (FVa) para formar o complexo protrombinase e o FIX ativado (FIXa) associa-se ao FVIII ativado (FVIIIa) para formar o complexo tenase. Ambos os complexos convertem a protrombina (FII) em trombina (FIIa) que, por sua vez, convertem o fibrinogênio em fibrina. No entanto, a quantidade de fibrina produzida durante esta primeira ativação é apenas ~2% da quantidade necessária para estabilizar o plugue hemostático. Portanto, o papel principal da via do TF é iniciar um processo referido como “explosão” da geração de trombina, por meio da qual a trombina ativa vários componentes da cascata de coagulação (como o FVIII) por retroalimentação positiva. Esta fase também é conhecida como propagação da cascata de coagulação. Adaptado de Lippi *et al.*¹

Conforme exposto acima, a rota de propagação da cascata de coagulação é imprescindível para a formação de um coágulo estável para interromper o sangramento. Portanto, a deficiência dos fatores VIII ou IX impede o progresso da coagulação e resulta na incapacidade de estancar sangramentos. Esta classe de coagulopatias é conhecida como hemofilia.

As hemofilias são coagulopatias ligadas ao cromossomo X e causadas por mutações nos genes que codificam os fatores VIII e IX da coagulação, levando às hemofilias A e B, respectivamente. Pacientes portadores destas alterações genéticas apresentam os respectivos fatores da coagulação ausentes ou não funcionais, de modo que não são capazes de gerar quantidades suficientes de trombina durante a coagulação. Estes defeitos resultam em complicações clínicas como artropatias e hemorragias que comprometem a qualidade de vida e podem levar à morte.

A hemofilia A é o tipo mais comum entre as hemofilias, acometendo 80-85% dos pacientes hemofílicos e apresenta uma incidência global de 1 caso para cada 5000 homens.² Segundo o relatório da Federação Mundial da Hemofilia (WFH) referente ao ano

de 2014, o Brasil é o terceiro país com o maior número absoluto de hemofílicos e o quarto com o maior número de pacientes com hemofilia A (**tabela 1**).

Tabela 1: Os cinco países com o maior número absoluto de hemofílicos. Fonte: Relatório da Federação Mundial de Hemofilia (WFH) publicado em 2015 e referente à 2014. *Os dados da Rússia são referentes ao ano de 2013.

País	Pacientes hemofílicos	Hemofilia A	Hemofilia B
EUA	17.131	13.010	4.121
Índia	16.731	14.450	2.281
Brasil	11.497	9.616	1.881
China	11.108	9.675	1.433
Rússia *	6.793	5.801	992

A gravidade da hemofilia A é classificada de acordo com a quantidade de FVIII no plasma, podendo ser definida como grave quando esta quantidade é menor que 0,01 UI/mL (menos de 1% da quantidade normal), moderada quando a quantidade está entre 0,01 e 0,05 UI/mL (entre 1% e 5% da quantidade normal) e leve quando há entre 0,05 e 0,40 UI/mL de FVIII circulante (entre 5% e 40% da quantidade normal).³

A molécula de FVIII é codificada pelo gene *F8* localizado no braço longo do cromossomo X e é sintetizada inicialmente como uma cadeia única subdividida em 6 domínios: (NH₂)-A1-A2-B-A3-C1-C2-(COOH).⁴ Em seguida, esta cadeia sofre diversas modificações pós-traducionais, incluindo clivagens que resultam na formação de um heterodímero composto pelas cadeias pesada (domínios A1, A2 e B) e leve (domínios A3, C1 e C2) e que são unidas por uma ligação mediada por íon metálico bivalente.⁵

Postula-se que o fígado seja o principal sítio produtor de FVIII, sobretudo após a observação de que o transplante deste órgão em pacientes hemofílicos corrigia o fenótipo da hemofilia A.⁶ A utilização de modelos animais e a engenharia genética permitiu demonstrar que a produção de FVIII pelos hepatócitos é irrisória e que as células endoteliais hepáticas são a principal população celular produtora de FVIII no fígado.⁷ No entanto, células endoteliais de outros órgãos contribuem com a secreção de FVIII, como as do rim e as células microvasculares dos pulmões.^{7,8}

As células endoteliais, bem como os megacariócitos, sintetizam uma glicoproteína chamada fator de von Willebrand (VWF), que tem papel fundamental na estabilidade do FVIII. Duas regiões da cadeia leve do FVIII medeiam sua ligação não covalente ao fator de VWF. A ligação ao VWF retarda a degradação proteolítica e o sequestro do FVIII por outras células, estendendo, portanto, sua meia-vida na circulação.⁹

1.2. Tratamento atual da hemofilia A

Atualmente, o tratamento para a hemofilia A é a terapia de reposição ou substituição, que consiste na administração intravenosa de FVIII a fim de assegurar a

hemostasia. Os pacientes podem receber a terapia de reposição sob o regime de demanda, isto é, no momento do sangramento, ou sob regime profilático, que consiste na infusão regular de FVIII para prevenir sangramentos. Uma das vantagens do regime profilático é prevenir sangramentos não traumáticos que ocorrem nas articulações, que levam à inflamação do tecido sinovial e podem causar artropatias debilitantes.¹⁰

A primeira estratégia terapêutica contra a hemofilia foi a transfusão de sangue.¹ Na década de 1950 e meados de 1960, os episódios de sangramento eram tratados por meio da infusão de plasma sanguíneo congelado. Neste período, a expectativa de vida para pacientes com hemofilia A grave era inferior a 20 anos.^{11,12}

Em 1965, Judith Pool observou que a fração decantada após a centrifugação do plasma congelado (crioprecipitado) era rica em fatores anti-hemofílicos.¹³ Este fracionamento inicial culminou no subsequente isolamento e liofilização de concentrados contendo FVIII a partir do plasma.¹⁴

A terapia de reposição utilizando o FVIII derivado do plasma (FVIIIIdp) reduziu em 40% a mortalidade dos pacientes com a forma grave da doença nos EUA.¹⁵ Entretanto, na década de 1980, aproximadamente 75% dos pacientes com hemofilia A grave estavam contaminados com HIV e 95% com o vírus da hepatite C.^{16,17} Isto era devido à deficiências no controle da qualidade do sangue de onde era obtido o FVIIIIdp. Com o aprimoramento das técnicas de detecção e inativação viral, nenhuma infecção viral relacionada ao uso dos preparados modernos de FVIIIIdp foi relatada entre 1990 e 2009.¹⁸

Em seguida, a geração do FVIII recombinante (FVIIIr) representou um avanço importante no tratamento da hemofilia A por apresentar diversas vantagens em relação ao FVIIIIdp: 1) Nos processos de produção em que não são utilizados componentes animais, o risco de contaminação viral do preparado de FVIIIr é mínimo; 2) A obtenção de FVIIIr não depende de doadores de plasma, evitando problemas de disponibilidade e 3) Por meio de mutações sítio-dirigidas ou da fusão com outras proteínas, por exemplo, é possível engenhar moléculas de FVIIIr cuja meia-vida seja mais durável, sua secreção mais eficiente e sua imunogenicidade reduzida.¹⁸

Nosso grupo de pesquisa têm contribuído com os avanços na área de produção de fatores da coagulação recombinantes. Tal processo é considerado desafiador pois, em geral, os produtos gênicos dos fatores da coagulação são muito grandes e/ou instáveis e sofrem numerosas modificações pós-traducionais. Já reportamos a produção do FVIIIr e FIXr biologicamente ativos em células humanas, as quais reproduzem fielmente as modificações pós-traducionais que ocorrem durante a síntese destas proteínas.¹⁹⁻²¹

Apesar dos avanços supracitados, ainda existem limitações importantes a serem superadas no tratamento da hemofilia A. Devido à meia-vida curta do FVIII na circulação (8-12 horas), o tratamento pós-traumático e/ou profilático requer infusões frequentes e

envolve suporte médico e familiar constantes. Esta combinação faz com que a terapia seja desgastante e cara.²² Segundo o relatório da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), a previsão de investimento para a compra de 600 milhões de unidades de FVIII em 2014 foi de 171 milhões de dólares (aproximadamente 400 milhões de reais, conforme cotação da época). Este valor corresponde à 91% do valor de todas as despesas empenhadas referentes ao programa de atenção aos pacientes portadores de doenças hematológicas em 2014, segundo o relatório de gestão do Ministério da Saúde. Estes dados fornecem a dimensão do impacto da hemofilia A nos custos com saúde pública no Brasil.

Uma outra dificuldade é o acesso venoso em crianças de 1-2 anos submetidas ao tratamento profilático. Embora esta abordagem seja importante para prevenir o desenvolvimento de artropatias,²³ as infusões frequentes geralmente demandam a colocação de dispositivos para acesso venoso central, visando facilitar a administração do FVIII pelos familiares. No entanto, a colocação destes dispositivos eleva os riscos de infecções, sepse e trombose.^{24,25}

Diante destas limitações, considera-se que a próxima meta para o tratamento da hemofilia A seja estabelecer uma terapia profilática durável, menos dispendiosa e sem a necessidade de infusões frequentes de FVIII.²² Postula-se que a consolidação da terapia gênica para a hemofilia seja capaz de cumprir tais objetivos. Esta estratégia consiste na transferência de sequências codificantes do FVIII ou FIX em pacientes hemofílicos por meio de vetores em sua maioria virais. Deste modo, espera-se que a expressão das cópias funcionais exógenas compense a disfunção dos genes mutantes, resultando na produção constante dos fatores da coagulação e na correção permanente do fenótipo da hemofilia.

1.3. Terapia gênica para a hemofilia

As hemofilias são consideradas um dos modelos de doença genética ideal para a aplicação da terapia gênica. Isto porque seu tipo de herança é recessivo, os fatores da coagulação não precisam ser produzidos em um sítio específico para exercer seus efeitos e pequenos incrementos na quantidade destas proteínas podem resultar em benefícios clínicos significativos. Por exemplo, o aumento na quantidade de FVIII de <1% para 10% do normal altera o quadro da hemofilia A de grave para leve,³ e o risco de sangramentos espontâneos torna-se mínimo.

Segundo um levantamento recente feito por Swystun e Lillicrap, os testes clínicos envolvendo a terapia gênica para a hemofilia A resultaram apenas em um aumento discreto (<4%) e transiente dos níveis de FVIII plasmático.²⁶ Atualmente, os resultados clínicos mais promissores são para a hemofilia B. Por exemplo, em 2011, foi reportado que a administração intravenosa de vírus adenoassociados (VAAs) carregando o gene do

FIX (VAA-FIX) resultou na expressão do referido fator em níveis que variaram entre 1% e 5% em 6 pacientes com hemofilia B grave.²⁷ Embora estes níveis de FIX circulante sejam baixos, eles já provêm benefícios clínicos significativos. Mais importante, o acompanhamento dos pacientes deste ensaio clínico demonstrou que a expressão do FIX exógeno era persistente, pois os pacientes ainda apresentavam 1-5% de FIX no plasma após mais de 3 anos da administração dos vírus.²⁸

É evidente que o progresso da terapia gênica para a hemofilia B têm sido muito mais rápido em comparação à hemofilia A. Isto é devido a uma série de limitações relacionadas ao gene codificante e à molécula do FVIII. O cDNA codificante do FVIII, mesmo após a deleção do domínio B, que é dispensável para a atividade pró-coagulante, possui um tamanho de ~4,5 kb. Ao considerarmos a inclusão de outros elementos essenciais no vetor de expressão, como promotor e *enhancer*, os vetores contendo o cDNA codificante do FVIII podem facilmente exceder a capacidade de empacotamento dos VAA, que é de ~5 kb.²⁹ Em contrapartida, o cDNA codificante do FIX possui apenas ~1,3 kb. Em segundo lugar, induzir altos níveis de expressão do FVIII *in vivo* tem sido notoriamente problemático por razões que ainda são pouco esclarecidas.²⁶ Em terceiro lugar, o potencial imunogênico do FVIII é superior ao do FIX, e ensaios pré-clínicos envolvendo a transferência do gene *F8* tem sido dificultados pela ativação da resposta imune contra as moléculas de FVIII.^{30,31}

Além das limitações associadas ao FVIII, obstáculos relacionados à terapia gênica em geral ainda precisam ser superados. Dentre eles destacam-se o risco de transdução indesejada das células germinativas e a resposta imunológica contra o capsídeo viral. O primeiro ensaio clínico envolvendo a administração de VAA-FIX foi interrompido imediatamente após a detecção do vetor viral no sêmen do paciente.³² Até hoje não existe um método capaz de controlar precisamente as populações celulares que serão transduzidas após a administração dos vetores virais. Além disso, cerca de 25% dos pacientes submetidos à terapia gênica com VAAs desenvolvem uma resposta imune contra epítomos do capsídeo viral. Esta resposta é mediada pelos linfócitos T CD8⁺ ativados após a apresentação de antígenos do capsídeo pelos próprios hepatócitos transduzidos, levando à destruição destas células e a consequente elevação dos níveis plasmáticos das enzimas hepáticas.²⁶ Um agravante é que 30-60% das pessoas já apresentam imunidade contra os VAAs, a julgar pela presença de anticorpos circulantes contra proteínas do capsídeo viral.^{26,33} Além de indicar maior propensão para desenvolver uma resposta imunológica contra as células transduzidas, estes anticorpos podem neutralizar os VAAs administrados, impedir a transdução das células-alvo e, portanto, comprometer a eficiência da terapia gênica.²⁷

Tais limitações associadas à terapia gênica implicam que o desenvolvimento de estratégias alternativas para a produção duradoura de FVIII *in vivo* continua importante.

A associação entre terapia celular e terapia gênica, que é o foco deste trabalho, representa uma abordagem promissora e que pode suprir as limitações da aplicação isolada da terapia gênica. Esta estratégia consiste em modificar geneticamente células para fazê-las produzir a proteína terapêutica *ex vivo* e depois implantá-las no receptor (**figura 2**). Desta forma, as células serviriam como unidades secretoras da proteína terapêutica e, portanto, a infusão de vetores virais seria desnecessária.

Figura 2: Comparação entre terapia gênica e terapia celular para a reposição de proteínas. Na terapia gênica convencional (esquerda), um vetor contendo a sequência codificante da proteína de interesse (1) é empacotado em vírus (2) que são administrados ao paciente para que haja a expressão da proteína de interesse (3) em algum órgão-alvo, como fígado ou músculo esquelético. Na terapia celular ou terapia gênica *ex vivo* (direita), as células são isoladas do paciente (1), modificadas *ex vivo* para expressar a proteína de interesse (2) e reimplantadas (3). Esta abordagem evita a administração direta de vírus para induzir a produção da proteína terapêutica *in vivo*. Adaptado de Swystun e Lillicrap.²⁶

1.4. Terapia celular para a hemofilia

Há registros antigos na literatura sobre o uso da terapia celular para o tratamento experimental da hemofilia. Em 1989, Palmer *et al.* reportaram a produção temporária de FIX em camundongos após implante subcutâneo de fibroblastos modificados para expressar o referido fator. No entanto, o FIX exógeno foi detectado por apenas 8 dias no plasma dos animais receptores, fato que pode ser explicado pela baixa sobrevivência dos fibroblastos após transplante.³⁴

Diversos tipos celulares, como células-tronco hematopoéticas, células endoteliais, fibroblastos e células-tronco mesenquimais já foram explorados como veículos produtores de fatores da coagulação. No entanto, atualmente, a principal limitação desta abordagem é a sobrevivência limitada das células transplantadas.²⁶ Para aumentar a enxertia das células, estudos em modelos animais recorrem à regimes de condicionamento como a indução de lesão no órgão alvo pela administração de compostos citotóxicos, irradiação local ou até ablação da medula óssea, no caso do uso de células-tronco/progenitoras

hematopoéticas.³⁵⁻³⁷ Perante as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da hemofilia, os riscos de tais regimes de condicionamento dificultam a aplicação clínica da terapia celular no tratamento da hemofilia. No único ensaio clínico envolvendo a terapia celular para a hemofilia A, fibroblastos autólogos modificados para expressar o FVIII foram transplantados no omento de pacientes hemofílicos. O procedimento não causou efeitos adversos, porém não houve evidência da expressão do FVIII exógeno nestes pacientes, exceto por um incremento mínimo nos níveis plasmáticos de FVIII (2%-6%) que ocorreu em alguns pacientes, mas que durou apenas 2-3 dias.³⁸

A manutenção do organismo multicelular implica que células-tronco, células progenitoras e células terminalmente diferenciadas interajam entre si e com os elementos acelulares formando uma unidade funcional referida como nicho celular. A sinalização parácrina e justácrina, a interação com a matriz extracelular e fatores como temperatura e concentração de O₂ são integrados pelas células constituintes no nicho e podem levar à proliferação ou quiescência, migração ou imobilidade, sobrevida ou ativação da morte celular.³⁹ Assim, uma abordagem para aumentar a sobrevida das células transplantadas seria garantir as condições para a recapitulação de seu nicho nativo, o que não pode ser feito por meio do implante de apenas uma população celular.

Estudos clássicos utilizando embriões de galinha, por exemplo, demonstraram que as células obtidas após a dissociação de um dado órgão retêm a capacidade de se reorganizar e formar um organoide similar ao órgão de onde elas foram isoladas.⁴⁰ Esta propriedade vem sendo amplamente explorada para a geração de estruturas organotípicas capazes de prover um nicho para a manutenção das células-tronco *in vitro*, para serem utilizadas em testes de toxicidade, em estudos sobre a morfogênese e também para servirem como unidades de reposição de órgãos e tecidos danificados.⁴¹

Neste trabalho, exploramos a hipótese de que células integrantes do nicho perivascular poderiam ser modificadas para expressar FVIII *ex vivo* e usadas na geração de organoides vascularizados secretores da referida molécula. A combinação de dois ou mais tipos celulares para a reconstituição do nicho celular aumentaria a sobrevida das células transplantadas sem a necessidade de indução de lesão.

Um dos componentes do nicho perivascular são as células endoteliais, as quais apresentam características vantajosas como veículos produtores de FVIII. As células endoteliais produzem o VWF, que se liga ao FVIII prolonga sua meia-vida. Além disso, em condições adequadas as células endoteliais podem se organizar em vasos sanguíneos que poderiam facilitar a difusão do FVIII produzido. No entanto, sabe-se que células endoteliais, quando transplantadas sozinhas, morrem rapidamente e não formam uma rede de vasos sanguíneos.⁴² Este fenômeno pode ser contornado pela expressão ectópica de moléculas anti-apoptóticas, como BCL-2.⁴³ Porém este procedimento aumenta o risco da geração de tumores.

Alternativamente, o co-transplante de uma população contendo células perivasculares, como as células estromais do tecido adiposo (ADSCs), poderia permitir a reconstituição do nicho perivascular e assegurar a sobrevivência das células endoteliais.

1.5. Células estromais do tecido adiposo (ADSCs)

A identificação das ADSCs foi um desdobramento da descoberta das células estromais mesenquimais multipotentes da medula óssea (MO-MSC) por Friedenstein *et al.* nas décadas de 1960-70. Na ocasião, Friedenstein *et al.* identificaram células estromais raras que apresentavam grande capacidade proliferativa *in vitro* e portanto eram capazes de originar colônias de células fibroblásticas após cultivo em baixa densidade. Por esta razão, foram inicialmente denominadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F).⁴⁴ O transplante da progênie de uma CFU-F resultava na formação de um ossículo ectópico contendo medula óssea, estroma, trabéculas e adipócitos,⁴⁵ levando esta população celular a ser denominada de “células-tronco osteogênicas” ou de “células-tronco estromais da medula óssea”.^{46,47} Anos mais tarde, Arnold I. Caplan cunha o termo “células-tronco mesenquimais” e o acrônimo correspondente MSCs (do inglês *mesenchymal stem cells*) para referir-se às CFU-F identificadas por Friedenstein *et al.* Esta denominação baseou-se na premissa de que estas células seriam progenitoras únicas de todos os tecidos conjuntivos de origem mesodérmica.⁴⁸ No entanto, a Sociedade Internacional para Terapia Celular recomendou que as culturas de células estromais da medula óssea fossem denominadas de células estromais mesenquimais multipotentes sempre que não for comprovada a presença de células-tronco genuínas utilizando ensaios *in vivo*. O termo células-tronco mesenquimais deveria ser restrito às células-tronco caracterizadas rigorosamente *in vivo*, mas o acrônimo MSCs foi mantido para ambas as situações.⁴⁹ Foi apenas em 2007 a primeira demonstração de que a medula óssea continha MSCs genuínas que ocupavam o nicho perivascular e eram capazes de originar ossículos ectópicos em transplantes seriados.⁵⁰

A descoberta das MO-MSCs abriu caminho para a identificação de células com propriedades semelhantes em outros tecidos, dentre eles o tecido adiposo, onde elas são referidas como células-tronco ou células estromais do tecido adiposo (ADSCs).^{51,52}

As ADSCs apresentam diversas características *in vitro* similares às MO-MSCs, como morfologia fibroblástica e capacidade de se diferenciar *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteoblastos e de gerar colônias de células fibroblásticas após cultivo em baixa densidade.⁵¹ No entanto, as ADSCs diferenciam-se das MO-MSCs por expressarem os marcadores de superfície celular CD36 e CD106 e por terem menor potencial de diferenciação osteogênica *in vivo*, por exemplo.^{53,54}

A identidade nativa das ADSCs ainda é debatida, porém sabe-se que elas ocupam o espaço perivascular do tecido adiposo.⁵⁵ Além disso, as ADSCs cultivadas secretam

fatores de crescimento pró-angiogênicos e são capazes de induzir a angiogênese *in vitro* via sinalização parácrina.^{56,57} Estas características indicam que as ADSCs não somente compõem o nicho perivascular mas também regulam a biologia das células endoteliais vasculares.

Outra característica importante é a facilidade de obtenção das ADSCs. Estas células podem ser obtidas em grandes quantidades a partir de amostras de lipoaspirados do tecido adiposo subcutâneo por procedimentos minimamente invasivos ou mesmo a partir de amostras que seriam descartadas após as cirurgias de lipoaspiração ou de abdominoplastia, por exemplo. Notavelmente, o Brasil é o segundo país com maior número de abdominoplastias e lipoaspirações realizadas, correspondendo a 17% do total de procedimentos deste tipo realizados no mundo (**tabela 2**).

Tabela 2: Ranking dos países com maior número de abdominoplastias e lipoaspirações realizadas em 2014. Dados retirados do relatório da Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS) disponível no site <http://www.isaps.org/news/isaps-global-statistics>.

Pos.	País	Abdominoplastias	Lipoaspirações	Total	% do total mundial
1	EUA	128.961	243.306	372.267	18%
2	Brasil	121.884	217.606	339.490	17%
3	México	33.201	63.302	96.503	5%
4	Colômbia	24.292	50.322	74.614	4%
5	Alemanha	21.536	51.978	73.514	4%
6	França	20.549	26.600	47.149	2%
7	Coréia do Sul	7.189	29.167	36.356	2%
8	Japão	2.021	22.454	24.475	1%

Assim, por ocupar o espaço perivascular, possuir propriedades pró-angiogênicas e serem de fácil obtenção e cultivo, optamos pelas ADSCs para a formação de organoides contendo o nicho vascular após o transplante combinado com células endoteliais.

Para garantir a formação de organoides altamente vascularizados, seria imprescindível que as propriedades nativas das ADSCs fossem mantidas durante o cultivo e a modificação gênica para expressar o FVIII *in vitro*. No entanto, sabe-se que os métodos convencionais de cultivo de MO-MSCs e ADSCs, que utilizam meios básicos suplementados com 10-15% de soro fetal bovino, permitem a deterioração de suas propriedades progenitoras, como o potencial de diferenciação.⁵⁸ Além disso, embora as MO-MSCs e ADSCs secretem fatores pró-angiogênicos *in vitro*, o uso destas células para o tratamento de doenças isquêmicas tem resultado em respostas clínicas variáveis.⁵⁹ Por estas razões, considera-se prioritário o desenvolvimento de estratégias de cultivo (ou pré-condicionamento) para intensificar o comportamento pró-angiogênico das ADSCs após transplante,⁶⁰ o que também seria essencial para assegurar a sobrevivência das células endoteliais co-transplantadas.

A formação do tecido adiposo é precedida por um processo angiogênico durante o qual ocorre a expansão de células endoteliais e a formação de uma rede vascular extensa. Durante este processo, as ADSCs e sua progênie também proliferam e interagem com os vasos sanguíneos recém-formados, estabilizando-os e constituindo os nichos vasculares. A diferenciação das células progenitoras em adipócitos só ocorre em uma segunda etapa, quando os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos se equilibram e a expansão vascular cessa.⁶¹ Portanto, durante a fase angiogênica da formação do tecido adiposo, a concentração dos fatores de crescimento pró-angiogênicos é alta e se correlaciona com a proliferação das ADSCs sem que elas ativem o programa de diferenciação. Ao mesmo tempo, as ADSCs devem interagir com as células endoteliais provendo as condições para a formação de vasos sanguíneos estáveis.

Portanto, hipotetizamos que mimetizar este meio pró-angiogênico durante o cultivo das ADSCs permitiria que elas proliferassem ao mesmo tempo que mantivessem suas propriedades progenitoras que são geralmente deterioradas nos procedimentos convencionais de cultivo. Ademais, esta estratégia também poderia aumentar a capacidade das ADSCs em estimular a sobrevivência das células endoteliais e a formação de vasos sanguíneos pelas células endoteliais co-transplantadas.

Assim, neste trabalho investigamos o efeito que o cultivo das ADSCs em meio de crescimento para células endoteliais (EGM-2) tem sobre suas propriedades progenitoras e pró-angiogênicas *in vitro* e *in vivo*. Em seguida, utilizamos as melhores condições de pré-condicionamento testadas para co-transplantar ADSCs e HUVECs expressando o FVIII humano a fim de gerar organoides vascularizados produtores da referida molécula em camundongos hemofílicos A imunodeficientes.

Objetivos

2. OBJETIVO GERAL

- Gerar um organoide ectópico vascularizado *in vivo* capaz de servir como veículo produtor do FVIII da coagulação.

2.1. Objetivos específicos

- Isolar, cultivar e caracterizar células estromais do tecido adiposo (ADSCs).
- Avaliar o efeito do cultivo em meio para crescimento de células endoteliais (EGM-2) na eficiência clonogênica, proliferação, diferenciação e perfil imunofenotípico das ADSCs.
- Avaliar o efeito do cultivo em EGM-2 no potencial das ADSCs em dar suporte à sobrevivência de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs) e à angiogênese *in vitro* e *in vivo*.
- Gerar e caracterizar uma linhagem de camundongos hemofílicos A imunodeficientes por meio do cruzamento entre camundongos NOD scid gama (NSG) e camundongos hemofílicos A.
- Modificar geneticamente ADSCs e HUVECs para expressar o FVIII humano da coagulação e a proteína verde fluorescente GFP.
- Co-transplantar subcutaneamente ADSC^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} para gerar um organoide vascularizado produtor do FVIII humano da coagulação *in vivo*.
- Avaliar a correção do fenótipo da hemofilia A nos camundongos transplantados.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e de biossegurança

As amostras de tecido humano remanescentes de abdominoplastias foram coletadas de pacientes que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os procedimentos envolvendo amostras humanas foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (parecer nº 375.415/2013).

Todos os procedimentos de experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto (protocolo nº 13.1.364.53.8).

Este projeto envolveu a manipulação de organismos geneticamente modificados e de agentes biológicos de classe de risco I e II, de acordo com a publicação “Classificação de Risco dos Agentes Biológicos” do Ministério da Saúde (2006). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto e os experimentos foram aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (processo nº 297/2015.007-02).

3.2. Animais

Durante a realização deste trabalho, foram utilizados apenas camundongos (*Mus musculus*) machos com idade entre 8 e 16 semanas. As matrizes das colônias de camundongos imunodeficientes da linhagem NOD scid gama (referidos como NSG) e da linhagem de camundongos hemofílicos A (referidos como F8) foram compradas da empresa JAX mice (NSG: estoque nº 005557; F8: estoque nº 004424).

Os camundongos NSG possuem o *background* genético da linhagem NOD/ShiLtJ e duas mutações de perda de função que os tornam imunodeficientes. A primeira é uma mutação espontânea no gene *Prkdc*, presente no cromossomo 16, que codifica a subunidade catalítica da proteína-quinase dependente de DNA (PRKDC), a qual é necessária para a recombinação V(D)J durante a formação dos linfócitos T e B. Portanto, esta mutação causa a imunodeficiência severa combinada (SCID, do inglês *severe combined immunodeficiency*), caracterizada pela depleção de ambas as populações de linfócitos. A segunda é uma mutação insercional sítio-dirigida no gene *Il2rg*, presente no cromossomo X, que codifica a cadeia gama do receptor de interleucina-2 (IL-2). Esta mutação bloqueia a sinalização via IL-2, o que impede a diferenciação em células NK, levando a depleção desta população celular.

Os camundongos da linhagem F8 possuem uma mutação insercional sítio-dirigida no éxon 16 do gene *F8*,⁶² que codifica o fator VIII da coagulação. Assim, estes animais

não apresentam atividade biológica do FVIII no plasma, pois a proteína produzida é presumivelmente truncada e, portanto, não funcional.⁶³

Os camundongos da linhagem C57BL/6J foram adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto.

Os camundongos hemofílicos A imunodeficientes (SCID/F8) foram gerados pelo cruzamento entre camundongos machos da linhagem NSG e fêmeas da linhagem F8, conforme detalhado na seção **3.27**.

No mínimo três dias antes dos experimentos, os animais que seriam utilizados foram transferidos para a sala de aclimação do Laboratório para Estudos Experimentais em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto. Na sala de aclimação, dotada de ciclo claro/escuro (12h/12h) e controle de temperatura (23°C), os animais foram mantidos em caixas de polipropileno autoclavadas (30cm x 20cm x 13cm – comprimento x largura x altura), dotadas de grade superior, filtro de ar e acondicionadas em estante ventilada. Os animais tiveram acesso à água e ração autoclavadas *ad libitum* e foram acondicionados em grupos de até cinco indivíduos por caixa.

A eutanásia foi realizada por meio da administração de doses excessivas de anestésico (375 mg/kg de ketamina e 37,5 mg/kg de xilazina). As referidas drogas foram administradas por via intraperitoneal.

3.3. Meios de cultivo e tampões

Solução tamponada de fosfato (PBS): 1,5 mM de fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich), 155 mM de cloreto de sódio (Sigma-Aldrich) e 2,7 mM de fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich), pH 7,2.

Tampão ACK para lise de eritrócitos: 154 mM de cloreto de amônio (Sigma-Aldrich), 10 mM de bicarbonato de potássio (Sigma-Aldrich) e 0,1 mM de EDTA, pH 7,2.

Tampão de sacarose (para concentração de vírions): 1 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 20 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) e 200 g/L de sacarose.

Meio α MEM: meio α MEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 15% em volume de soro fetal bovino caracterizado (SFB) (Hyclone), 26 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

Meio DMEM: meio DMEM-low glucose (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% em volume de SFB, 44 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

Meio EGM-2: meio EBM-2 (Lonza) suplementado com 2% em volume de SFB, ácido ascórbico, hidrocortisona, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF),

fator de crescimento similar à insulina-1 (IGF-1), 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

Meio para células HEK 293FT: meio DMEM-high glucose (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% em volume de SFB, 44 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

3.4. Amostras de tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo eram remanescentes de abdominoplastias realizadas na Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Embora não houvesse restrição quanto ao sexo dos doadores, as amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas de mulheres com 30-40 anos de idade. Os critérios de inclusão dos doadores foram: não estar utilizando imunossupressores, não apresentar infecção sistêmica ou local, não possuir diagnóstico de neoplasia, não possuir sinais clínicos de desnutrição e não apresentar insuficiência renal, hepática, cardíaca, respiratória ou neurológica.

Um ou dois fragmentos de tecido adiposo subcutâneo totalizando 250-500 g foram coletados de cada paciente no centro cirúrgico em frascos estéreis e processados imediatamente para o isolamento de células da fração estromal vascular (FEV).

3.5. Isolamento de células da fração estromal vascular do tecido adiposo (FEV)

Os fragmentos de tecido adiposo foram lavados três vezes com PBS suplementado com antibiótico e antimicótico (Anti-anti, Gibco) e, em seguida, a pele presente nas amostras foi removida e descartada. Após este procedimento, as amostras foram fragmentadas em pequenas partes ($\sim 5 \text{ mm}^3$) para aumentar a superfície de contato com a solução de dissociação enzimática.

Para a dissociação enzimática, os fragmentos de tecido adiposo foram misturados com um volume equivalente de solução estéril de collagenase IA 0,1% (Sigma-Aldrich) dissolvida em meio RPMI (Gibco) sem soro e suplementado com antibiótico e antimicótico. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C durante 1 hora. Ao longo da incubação, a amostra era agitada vigorosamente por 10 s a cada 15 min. Após a digestão, as amostras foram misturadas com um volume equivalente de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e filtradas em uma peneira metálica estéril (poros de aproximadamente 2 mm^2) para a remoção de fragmentos de tecido não digerido.

O material filtrado foi aliquoteado em tubos de 50 mL e centrifugado a 500 *g* durante 5 min à temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação, a fase sobrenadante contendo os adipócitos e lipídeos livres foi aspirada juntamente com a fase aquosa

intermediária, restando apenas a fração precipitada que consistia na fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo.

A FEV foi lavada com PBS, centrifugada (300 *g*, 5 min, TA) e incubada com 20 mL de tampão ACK para lise de eritrócitos durante 10 min no gelo. Após este período, foram adicionados mais 20 mL de meio RPMI + 10% de SFB e as amostras foram centrifugadas (300 *g*, 5 min, TA). Em seguida, a FEV foi processada para o isolamento das células endoteliais vasculares (CEVs) e/ou das células estromais do tecido adiposo (ADSCs), conforme descrito a seguir.

3.6. Isolamento e cultivo das células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs)

Para o isolamento das CEVs, a FEV foi filtrada sequencialmente em peneiras de 100 μm e de 40 μm (diâmetro dos poros) (BD Falcon). As células que passaram pelos filtros foram plaqueadas em placas de cultivo recobertas com gelatina porcina (Sigma-Aldrich) ou fibronectina humana (Sigma-Aldrich) na presença de meio para células microvasculares ECM (Sciencell). As amostras retidas nos filtros, as quais continham fragmentos de vasos sanguíneos (vide Resultados), foram misturadas com 10 mL de uma solução contendo 0,25% de tripsina/EDTA em PBS e incubadas a 37 °C em banho-maria durante 15 min, sob agitação a cada 5 min. Após a digestão com tripsina, as amostras foram filtradas sequencialmente em peneiras de 100 μm e de 40 μm . As células que passaram pelas peneiras foram também plaqueadas em placas de cultura recobertas com gelatina ou fibronectina humana na presença de meio ECM.

Após 48 h de cultivo, o sobrenadante contendo células mortas e/ou células não aderentes foi descartado. As células aderentes foram tripsinizadas e incubadas com anticorpos anti-CD31 conjugados à microesferas metálicas (Miltenyi Biotec) conforme as instruções do fabricante. Após a marcação com os anticorpos, a suspensão celular foi submetida a dois ciclos consecutivos de seleção em colunas magnéticas LS (Miltenyi Biotec) segundo as recomendações do fabricante. As células CD31⁺ presas à coluna foram recuperadas e plaqueadas em meio ECM em placas de cultura recobertas com gelatina porcina ou fibronectina humana.

3.7. Isolamento e cultivo das células estromais do tecido adiposo (ADSCs)

Para o isolamento das ADSCs, as células da FEV foram plaqueadas a uma densidade de $1,3 \times 10^4$ células/cm² em diferentes meios de cultura, conforme descrito para cada experimento na seção de resultados. Após o plaqueamento, os frascos de cultura foram mantidos em incubadoras com 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 80% de umidade relativa e monitorados quanto à proliferação de células fibroblásticas que correspondiam às ADSCs.

3.8. Quantificação de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F)

Para a determinação da frequência de CFU-F, as células FEV foram plaqueadas a uma densidade de ~ 18 células/cm² em placas de Petri de 100 mm nos meios α MEM, DMEM ou EGM-2 ($n = 3$ placas por grupo). Após 10-14 dias, as colônias foram observadas por microscopia de contraste de fase e contabilizadas. Após a contagem, as mesmas colônias foram coradas com corante de Leishman e fotografadas.

3.9. Avaliação do potencial proliferativo das ADSCs *in vitro*

Para determinar seu potencial proliferativo, 1×10^4 ADSCs na segunda passagem foram plaqueadas em placas de 6 poços na presença dos meios EGM-2, α MEM e DMEM ($n = 3$ poços por grupo). Ao atingirem 70-80% de confluência, as células de cada poço foram contadas e novamente plaqueadas, sempre na mesma quantidade (1×10^4 ADSCs/poço). A proliferação das ADSCs foi monitorada por 31 dias. Os números de células inicial e final em cada passagem foram usados para calcular o número de duplicações da população celular por meio da seguinte equação:

$$n = 3,3 \times \log_{10} \left(\frac{Nf}{Ni} \right)$$

Sendo: n = número de duplicações, Nf = número final de células e Ni = número inicial de células plaqueadas.

3.10. Indução da adipogênese *in vitro*

Para a indução da adipogênese, 4×10^4 ADSCs foram plaqueadas em placas de 24 poços ($n = 4$ poços), e após 24 h, o meio de cultivo foi substituído pelo meio indutor de adipogênese que consistia em meio DMEM-high glicose (Thermo Fischer Scientific) suplementado com 10% em volume de SFB, 1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich), 100 μ M de indometacina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina. O meio foi substituído a cada três dias e as células foram cultivadas por 14 dias. Ao final deste período, três poços foram submetidos à coloração com *oil red O* (Sigma-Aldrich) para a visualização de vesículas lipídicas e posterior quantificação. O poço restante foi corado com *oil red O*, contra-corado com hematoxilina de Harris e fotografado.

ADSCs mantidas sem os compostos indutores de adipogênese (2×10^3 células/poço) foram usadas como controles do experimento.

3.11. Coloração com *oil red O* e quantificação da diferenciação adipogênica

As amostras foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em solução tamponada de formaldeído 3,7% por 1 h, à TA. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas por 5 min em solução aquosa contendo 60% de isopropanol e coradas com

solução de *oil red O* por 1 h. Após este período, as amostras foram lavadas em água deionizada por 4 vezes, a fim de remover o excesso de corante. Para o registro fotográfico, um dos poços foi corado em hematoxilina de Harris por 10 min e lavado com água deionizada até a remoção do excesso de corante.

Para a quantificação da diferenciação adipogênica, os poços corados apenas com *oil red O* (n = 3) foram incubados com 500 µL de isopropanol absoluto sob agitação constante (250 RPM) por 15 min à TA para a recuperação do corante. Em seguida, alíquotas do sobrenadante (150 µL) foram submetidas à quantificação da densidade óptica (DO) a 500 nm para estimar a quantidade de corante *oil red O* recuperado.

3.12. Indução da osteogênese *in vitro*

Para a indução da osteogênese, 1×10^4 ADSCs foram plaqueadas em placas de 24 poços (n = 3 poços) e, após 24 h, o meio de cultivo foi substituído pelo meio indutor de osteogênese que consistia em meio DMEM-low glucose (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% em volume de SFB, 1 µM de dexametasona, 10 mM de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 200 µM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina e 100 µM de estreptomicina. O meio foi substituído a cada três dias e as células foram cultivadas por 30 dias. Ao final deste período, as amostras foram coradas com vermelho de alizarina para a detecção de depósitos de cálcio.

3.13. Coloração com vermelho da alizarina e quantificação da diferenciação osteogênica

Após a indução da diferenciação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas em solução tamponada de formaldeído 3,7% por 1 h à TA. Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com água deionizada e incubadas em solução de vermelho de alizarina 2% (pH 4,1 – 4,3) por 45 minutos, no escuro, à TA. Após este período, as amostras foram lavadas 4 vezes em água deionizada para a remoção do excesso de corante e mantidas em PBS para o registro fotográfico.

Após o registro das imagens, todo o líquido presente nos poços foi aspirado e as amostras foram submetidas à quantificação da diferenciação osteogênica utilizando um protocolo publicado anteriormente,⁶⁴ com pequenas adaptações.

Para a extração do corante, as amostras foram incubadas com ácido acético 10% por 30 min sob agitação constante (250 RPM) à TA. Em seguida, a monocamada celular foi removida mecanicamente com o auxílio de ponteiros de 1 mL. As suspensões resultantes foram transferidas para tubos de 1,5 mL, homogeneizadas em vórtex e recobertas com óleo mineral. As amostras foram aquecidas a 85 °C por 10 min e transferidas para o gelo durante 5 min. A suspensão foi centrifugada a 20.000 g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para tubos limpos de 1,5 mL. Em seguida, o pH das

amostras foi ajustado para 4,1 – 4,5 por meio da adição de hidróxido de amônio 10%. Por fim, alíquotas foram submetidas à quantificação da densidade óptica a 405 nm para estimar a quantidade de vermelho de alizarina recuperado das células.

3.14. Avaliação da expressão gênica nas ADSCs por PCR quantitativo (qPCR)

Após o cultivo nos diferentes meios por duas passagens, o RNA total das ADSCs foi extraído com o kit RNeasy mini kit (Qiagen) acrescido da enzima DNase RNase-free DNase Set (Qiagen) para evitar a contaminação do extrato com DNA genômico. Dois microgramas do RNA total foram utilizados para a reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com a instruções do fabricante. Duplicatas dos cDNAs obtidos de cada amostra foram utilizadas para a qPCR utilizando sondas específicas (Applied Biosystems) para genes relacionados à adipogênese (receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos [*PPAR*γ], proteína ligante de ácido graxo 4 [*FABP4*], proteína alfa ligante do *enhancer* CCAAT [*CEBPa*], adiponectina [*ADIPOQ*] e leptina [*LEP*]), para genes relacionados à osteogênese (osteonectina [*SPARC*], osteocalcina [*BGLAP*] e fator de transcrição relacionado à Runt 2 [*RUNX2*]) e para o gene codificante da enzima telomerase (*TERT*).

A expressão dos genes-alvo foi normalizada pela expressão do gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), sendo que a quantificação relativa dos transcritos, expressa como unidades relativas de expressão ou URE, foi feita por meio do uso da seguinte fórmula:⁶⁵

$$URE = 10.000 \div 2^{(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ GAPDH})}.$$

3.15. Análise do perfil imunofenotípico das ADSCs e HUVECs

Para a análise da expressão de moléculas de superfície celular nas ADSCs e HUVECs, suspensões contendo 2×10^5 células em 100 µL de PBS foram incubadas com 0,2 µg de cada anticorpo durante 15 min, no escuro e à TA. Imediatamente após o período de incubação, as células foram lavadas em PBS e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo 8.7.

3.16. Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB)

A detecção da bioluminescência foi realizada com o equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer).

Para o PIBB *in vitro*, adicionou-se D-luciferina (Perkin Elmer) ao meio de cultivo a uma concentração final de 150 µg/mL. Em seguida, as placas foram imediatamente submetidas à captura de imagens.

Para o PIBB *in vivo*, os camundongos foram infundidos com 150 mg/kg de D-luciferina por via intraperitoneal e devolvidos às gaiolas por 15 minutos. Em seguida, os animais foram anestesiados por inalação de 2,5% de isoflurano em oxigênio, posicionados no interior da câmara escura do equipamento IVIS e mantidos sob constante sedação em 1,5% de isoflurano durante a captura das imagens.

A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software Living Image 3.0, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi manualmente desenhada para abranger o sinal bioluminescente, cuja intensidade é reportada como fluxo de fótons, expresso em fótons/s.

3.17. Produção de vírions carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro

Os vírions carregando o vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro (gentilmente cedido pelo Dr. Deivid de Carvalho Rodrigues, Universidade de Toronto, Canadá) foram utilizados para transduzir as ADSCs e HUVECs e fazê-las expressar a proteína repórter bioluminescente luciferase 2 (sequencia com códons otimizados para expressão em células de mamíferos). Além da luciferase 2, este vetor codifica a proteína puromicina N-acetil-transferase, a qual confere resistência ao antibiótico puromicina. A expressão de ambos os genes é controlada pelo promotor do vírus de célula-tronco murina (MSCV).

Para a produção dos vírions, células HEK 293FT cultivadas em placas de 150 mm (80% de confluência) foram transfectadas simultaneamente com 12 µg do vetor pMSCV-Luc2-T2A-Puro, 8 µg do vetor pCMV_dr8.91 (que codifica o capsídeo do HIV e os componentes enzimáticos virais) e 4 µg do vetor pMD2.G (que codifica o envelope do VSV-G). A transfecção foi realizada com politilenimina (PEI) linear de 25 kDa (Alfa Aesar), utilizando uma taxa de nitrogênio/fósforo de 50, conforme reportado anteriormente.⁶⁶ Dezoito horas após a transfecção, o meio de cultura foi substituído e as células foram cultivadas por mais 48 h. Após este período, o sobrenadante contendo os vírions foi coletado, centrifugado a 300 *g* (15 min, TA) para a remoção de células em suspensão e filtrado à vácuo utilizando filtro de PVDF com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Após a coleta, o meio contendo vírions foi aliqotado em tubos para ultracentrifuga, seguido pela adição cuidadosa de 4 mL de tampão de sacarose 30% no fundo dos tubos, criando uma camada subjacente com a referida solução. Os vírions foram concentrados por ultracentrifugação a 112.500 *g* (25.000 RPM, rotor SW 28, Beckman Coulter) durante 2 h à 4 °C. Ao final deste período, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram vertidos sobre papel absorvente por 10 min para remoção do excesso de líquido. Em seguida, 200 µL de PBS foram adicionados a cada um dos tubos e os mesmos foram mantidos a 4-8 °C até a manhã seguinte. Por fim, os vírions foram suspensos em PBS e congelados em alíquotas individuais a -80 °C.

3.18. Titulação dos vírions carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro por PCR quantitativa (qPCR)

Para o cálculo do título viral, 1×10^5 células da linhagem HEK 293FT foram incubadas com 2 μL e 5 μL da suspensão concentrada de vírions pMSCV-Luc2-T2A-Puro na presença de 8 $\mu\text{g/mL}$ de polibreno (Sigma-Aldrich) *overnight*. Após 72 horas da transdução, o DNA genômico das células foi extraído com o kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, as amostras de DNA foram submetidas à qPCR para amplificação da região LTR do vetor lentiviral integrado ao genoma. Foram incluídas na reação uma curva-padrão com quantidades conhecidas de cópias do vetor pMSCV-Luc2-T2A-Puro e outra com quantidades conhecidas de DNA das células HEK293FT para amplificação do gene endógeno β -actina (βACTN). As qPCR foram feitas utilizando o kit TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) e o aparelho termociclador Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). As sequências dos primers foram as mesmas utilizadas por Matsui *et al.*⁶⁷

O número de cópias do vetor lentiviral integradas ao genoma e do gene endógeno nas amostras testadas foram determinados a partir dos dados de amplificação das curvas-padrão. Estes valores foram usados para o cálculo do título viral, expresso em unidades infectantes por mL (UI/mL), por meio da seguinte fórmula:⁶⁸

$$\text{Título viral (UI/mL)} = \frac{\frac{\text{Núm cópias LV}}{\text{Núm cópias } \beta\text{ACTN}/2} \times \text{Núm células} \times 1000}{\text{Volume do meio contendo vírions } (\mu\text{L})}$$

3.19. Geração de ADSCs e HUVECs expressando luciferase 2

Para a indução da expressão de luciferase 2, as ADSCs e HUVECs foram transduzidas com os vírions carreadores do vetor pMSCV-Luc2-T2A-Puro. Para isso, tanto as ADSCs como as HUVECs foram incubadas com 3 partículas infectantes por célula (multiplicidade de infecção [MOI] = 3) na presença de 8 $\mu\text{g/mL}$ de polibreno adicionados aos seus respectivos meios de cultura. Após 18 horas de incubação, o meio foi substituído e as células foram cultivadas por mais 48 h. Após este período, as ADSCs e HUVECs foram cultivadas por 6 dias na presença de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina, respectivamente, para a eliminação das células não transduzidas. O meio contendo puromicina foi trocado a cada 2 dias. Após a seleção, a bioluminescência das ADSC^{luc} e HUVEC^{luc} foi avaliada por PIBB *in vitro*.

3.20. Avaliação da apoptose de HUVECs por citometria de fluxo

Após cultivo nas condições especificadas em cada experimento, as HUVECs presentes no sobrenadante dos poços de cultura foram coletadas juntamente com as células aderentes, as quais foram removidas por incubação rápida (2 min) em tripsina-EDTA 0,05% à 37 °C. As células foram lavadas 1 vez em PBS e marcadas com anexina V e iodeto de propídio (IP) utilizando o kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences) com pequenas alterações em relação às instruções do fabricante. As células foram suspensas em 300 µL de tampão de ligação contendo 5 µL de anexina V conjugado com fluoresceína (FITC) e incubadas por 15 min à TA, no escuro. Em seguida, foram adicionados 20 µL de IP às suspensões de células e as mesmas foram analisadas por citometria de fluxo (10 mil eventos/amostra). A frequência de células vivas (anexina V⁻IP⁻), de células em apoptose recente (anexina V⁺IP⁻) e de células em apoptose tardia ou necrose (anexina V⁺IP⁺) foram quantificadas utilizando o software FlowJo 8.7.

3.21. Co-cultivo direto de ADSCs e HUVEC^{luc}

Para os ensaios de co-cultivo direto, 4×10^4 HUVEC^{luc} foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio EGM-2 e cultivadas por 24 h. Depois, as culturas foram lavadas 2 vezes em PBS e receberam suspensões contendo 1×10^4 , 2×10^4 ou 4×10^4 ADSC-αMEM ou ADSC-EGM em MRFC. Assim, as proporções de ADSCs e HUVEC^{luc} nos co-cultivos foram de 0,25:1, 0,5:1 e 1:1 (n = 3 poços por proporção). As células foram cultivadas por mais 48 h e submetidas à 1) quantificação de bioluminescência por PIBB para avaliação da sobrevivência das HUVEC^{luc} e à 2) coloração com hematoxilina de Harris para análises morfológicas. HUVEC^{luc} cultivadas sozinhas em EGM-2 ou em MRFC (n = 3 poços por meio) foram usadas como controles do experimento.

Para a identificação das ADSCs e HUVEC^{luc}, co-cultivos de HUVEC^{luc} com ADSC-αMEM ou ADSC-EGM na proporção de 1:1 foram mantidos sobre lamínulas de vidro recobertas com laminina (Biocoat, BD Biosciences) colocadas em placas de 24 poços e utilizando os mesmos procedimentos descritos acima. Ao término do co-cultivo, as células foram submetidas à marcação por imunofluorescência com anticorpos anti-CD31 e anti-CD90, cujos antígenos-alvo são expressos exclusivamente pelas HUVEC^{luc} ou pelas ADSCs, respectivamente.

3.22. Geração do meio condicionado de ADSC-αMEM (αMEM-MC) e de ADSC-EGM (EGM-MC)

Para a geração do meio condicionado, 1×10^6 ADSC-αMEM ou ADSC-EGM foram plaqueadas em placas de Petri de 100 mm ($\sim 1,8 \times 10^4$ células/cm²) nos seus respectivos meios e cultivadas até o dia seguinte. As células foram lavadas 3 vezes em PBS para a remoção dos resquícios do meio de cultura e cada placa recebeu 8 mL de MRFC, pois desejava-se avaliar o efeito do secretoma das ADSCs perante a privação de fatores de

crescimento. Após mais 48 h de cultivo em MRFC, o meio condicionado foi coletado, filtrado em filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro e congelado a -80 °C até seu uso nos experimentos.

3.23. Efeito do meio condicionado das ADSCs na sobrevida das HUVEC^{luc} perante a privação de fatores de crescimento.

O efeito das ADSCs na sobrevida das HUVEC^{luc} *in vitro* foi avaliado tanto por PIBB quanto pela quantificação de células apoptóticas por citometria de fluxo. Para a avaliação por PIBB, 4x10⁴ HUVEC^{luc} foram plaqueadas em placas de 24 poços na presença de αMEM-MC ou EGM-MC (n = 3 poços por meio). Células mantidas em MRFC e EGM-2 foram usadas como controles (n = 3 poços por meio). Após o plaqueamento, as HUVEC^{luc} foram cultivadas por 48 h, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de MRFC suplementado com 150 µg/mL de D-luciferina e as amostras foram imediatamente submetidas à quantificação da bioluminescência para estimar a quantidade de HUVEC^{luc} vivas utilizando o PIBB. Após a análise por PIBB, as células foram coradas com hematoxilina de Harris por 10 min e fotografadas.

Para a quantificação de células apoptóticas, 2x10⁵ HUVEC^{luc} foram plaqueadas em placas de 6 poços na presença de αMEM-MC ou EGM-MC (n = 3 poços por grupo). Células mantidas em MRFC ou EGM-2 foram usadas como controles (n = 3 poços por grupo). Após 48 h de cultivo, as células foram submetidas à marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) e analisadas conforme descrito na seção **3.20**.

3.24. Efeito do meio condicionado das ADSCs na formação de túbulos endoteliais *in vitro* pelas HUVEC^{luc}

O ensaio de formação de túbulos endoteliais é uma abordagem para avaliar a angiogênese *in vitro*. Para estudar o efeito do secretoma durante este processo e perante a privação de fatores de crescimento, 300 µL de uma mistura de Matrigel e PBS (1:1) foram adicionados em cada poço de uma placa de 24 poços que foi mantida a 37 °C em uma incubadora umidificada durante 45 min para a formação de um gel. Em seguida, 7x10⁴ HUVEC^{luc} em αMEM-MC ou EGM-MC foram plaqueadas em cada poço (n = 3 poços por grupo). HUVEC^{luc} misturadas em MRFC e EGM-2 foram usadas como controles (n = 3 poços por grupo). As células foram cultivadas por 24 h e fotografadas em um microscópio de contraste de fase (n = 5 fotos por poço). O comprimento total dos túbulos endoteliais em cada campo fotografado foi calculado com o auxílio do software Image J e utilizado como parâmetro quantitativo para avaliar a angiogênese *in vitro*.

3.25. Preparação das matrizes de colágeno tipo I para transplante

Para preparar 1 mL de solução neutra de colágeno tipo I, foram misturados primeiramente 510 µL de H₂O deionizada, 60 µL de NaOH 10 mM e 100 µL de meio DMEM-high glucose concentrado 10X suplementado com 44 mM de NaHCO₃ e 10 mM de HEPES. Em seguida, 330 µL de uma solução de colágeno tipo I isolado da cauda de ratos (Corning) foi adicionada a esta mistura a fim de atingir uma concentração final de 3 mg/mL de colágeno. Toda a preparação das matrizes foi feita no gelo e utilizando reagentes e ponteiros gelados para evitar a polimerização precoce do colágeno.

3.26. Transplantes de ADSCs, HUVECs e células da FEV em camundongos NSG

3.26.1. Transplante subcutâneo de ADSCs e HUVECs em matriz de colágeno

As quantidades de ADSCs e HUVECs e as combinações entre ambos os tipos celulares estão descritos para cada experimento na descrição dos resultados. Para o todos os transplantes, ADSCs e/ou HUVECs viáveis (determinado por contagem com azul de Trypan), foram misturadas com 300 µL de solução de colágeno tipo I e inoculadas subcutaneamente no dorso de camundongos da linhagem NSG.

3.26.2. Transplante subcutâneo de células da FEV em matriz de colágeno e Matrigel

Imediatamente após seu isolamento, 5×10^5 células viáveis da FEV (determinado por contagem com azul de Trypan) foram misturadas com 300 µL de colágeno tipo I a 3 mg/mL ou com 300 µL uma solução de Matrigel e PBS (1:1). As misturas foram injetadas subcutaneamente no flanco posterior direito de animais NSG (n = 3 animais por grupo). Após 60 dias, os implantes foram removidos, fixados com solução de formaldeído tamponada 3,7% por 24 h (TA), embebidos em meio para congelamento OCT e congelados utilizando acetona resfriada com gelo seco. As amostras foram seccionadas (7 µm de espessura) e submetidas à coloração com hematoxilina e eosina para análises histológicas.

3.27. Geração de camundongos hemofílicos A imunodeficientes (SCID/F8)

Para a geração de camundongos hemofílicos A imunodeficientes (SCID/F8), animais machos imunodeficientes da linhagem NSG foram cruzados com fêmeas hemofílicas da linhagem F8. Os filhotes da primeira geração (F1) foram caracterizados genotipicamente quanto à presença dos alelos mutantes do gene *F8* para validar o cruzamento. Em seguida, estes animais foram cruzados entre si para produzir a geração F2. Os integrantes da geração F2 foram submetidos a uma primeira seleção de animais homozigotos ou hemizigotos (no caso dos machos) para o alelo mutante do gene *F8*. Em seguida, os animais selecionados foram caracterizados quanto à presença do alelo

mutante do gene *Prkdc*. Os animais que possuíam apenas alelos mutantes para ambos os genes foram usados como matrizes para a fundação da colônia de camundongos SCID/F8. Durante a geração da colônia, foram selecionados apenas camundongos albinos ao invés dos camundongos com coloração agouti. Esta seleção foi feita para facilitar o uso de técnicas empregando estes animais no futuro, pois a visualização de veias periféricas é mais fácil em animais albinos e a falta de melanina reduz a absorção da luz pelo pelos e, assim, facilita a detecção de células por PIBB.

3.28. Genotipagem dos alelos de *F8* e *Prkdc*

Os *primers* utilizados para as genotipagens durante a geração dos camundongos SCID/F8 estão listados na Tabela 3 e os parâmetros usados nas PCR estão apresentados na Tabela 4.

A caracterização genotípica para os alelos de F8 foi realizada por uma PCR simples, sendo que alelo *F8* selvagem geraria um fragmento de 620 pares de base (pb) e o alelo mutante um fragmento de 420 pb. Após a PCR, os produtos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com Gel Red (Biotium) para visualização.

Para a caracterização genotípica para os alelos de *Prkdc*, foi inicialmente realizada uma PCR. Em seguida, os produtos da reação foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *AluI* durante 2 h a 37 °C. Esperava-se que, após a digestão, o alelo *Prkdc* selvagem gerasse dois fragmentos, um de 68 pb e outro de 11 pb. Como a mutação resultava na inserção de um sítio adicional de clivagem pela enzima *AluI*, o alelo mutante geraria três fragmentos contendo 38, 28 e 11 pb. Após a digestão, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 5% e corados com Gel Red para visualização.

Tabela 3: Primers utilizados para genotipagem durante a geração dos camundongos SCID/F8.

Gene-alvo	Orientação	Sequência (5'→3')	Alelo(s)
F8	Forward	GAGCAAATTCCTGTACTGAC	Selvagem e mutante
	Reverse	TGCAAGGCCTGGGCTTATTT	Apenas selvagem
	Reverse	TGTGTCCCGCCCCTTCCTTT	Apenas mutante
Prkdc	Forward	GGAAAAGAATTGGTATCCAC	Selvagem e mutante
	Reverse	AGTTATAACAGCTGGGTTGGC	Selvagem e mutante

Tabela 4: Ciclo de temperaturas usadas na PCR para genotipagem dos alelos *F8* e *Prkdc*.

Ciclo de temperatura: PCR <i>F8</i>			Ciclo de temperatura: PCR <i>Prkdc</i>		
Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	3 min	1	94 °C	1,5 min	1
94 °C	30 s	35	94 °C	30 s	35
61,2 °C	30 s		53 °C	30 s	
72 °C	1 min		72 °C	30 s	
72 °C	2 min	1	72 °C	2 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

3.29. Quantificação de linfócitos T e B no baço de camundongos SCID/F8 por citometria de fluxo

Para a quantificação de linfócitos B, T CD4 e T CD8, os baços de camundongos NSG, F8 e SCID/F8 foram isolados ($n = 4$ NSG ou F8; $n = 8$ SCID/F8), macerados para a liberação dos esplenócitos e lavados com PBS + 0,5% de BSA. Em seguida, as amostras foram incubadas em tampão de lise de eritrócitos ACK por 5 min no gelo. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas (300g, 5 min, TA) e filtradas consecutivamente em peneiras com poros de 100 μm e 45 μm . Em seguida, 10^6 células foram incubadas com 0,2 μg dos anticorpos anti-B220/CD45R, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 por 30 min à TA no escuro. Por fim, as células foram lavadas, incubadas em solução de formaldeído 1% em PBS e mantidas na geladeira até o dia seguinte, quando foram submetidas à análise por citometria de fluxo. A frequência de linfócitos B (B220/CD45R⁺), T CD4 (CD3⁺CD4⁺) e T CD8 (CD3⁺CD8⁺) foi quantificada com o auxílio do software FlowJo 8.7.

3.30. Produção de vírions carregadores do vetor lentiviral pCMV-FVIII Δ B-IRES-GFP

Os vírions carregando o vetor lentiviral pCMV-FVIII Δ B-IRES-GFP (gentilmente cedidos pela Dra. Virgínia Picango e Castro, Hemocentro de Ribeirão Preto) foram utilizados para transduzir as ADSCs e HUVECs e fazê-las expressar o FVIII humano da coagulação com o domínio B parcialmente deletado, o que reduz o tamanho da sequência de DNA codificante para 170 kb e não afeta a atividade biológica da proteína produzida. Além do FVIII, este vetor codifica a proteína repórter fluorescente GFP. A expressão de ambos os genes é controlada pelo promotor do citomegalovírus humano (CMV).

Para a produção das partículas virais, 1×10^7 células HEK 293FT foram plaqueadas em frascos T175 e transfectadas simultaneamente com 5 μg do vetor pMD2.G, 10 μg do vetor pCMV_dr8.91 e 15 μg do vetor pCMV-FVIII Δ B-IRES-GFP. A transfecção foi feita com o polímero catiônico PEI segundo a metodologia reportada por Segura *et al.*⁶⁹

Após 48 h da transfecção, o meio contendo vírions foi coletado, filtrado em filtros de PVDF (poros de 0,45 μm) e congelado à -80 °C até seu uso para transdução.

3.31. Titulação dos vírions carreadores do vetor lentiviral pCMV-FVIIIΔB-IRES-GFP por citometria de fluxo

Para a titulação viral, 2×10^5 células HEK 293FT foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas com diferentes volumes do meio contendo os vírions pCMV-FVIIIΔB-IRES-GFP na presença de 8 µg/mL de polibreno. Após 72 h da transdução, as células foram tripsinizadas e analisadas quanto à frequência de células GFP⁺ por citometria de fluxo. Apenas os dados das amostras com 15% de células GFP⁺ foram usadas para o cálculo do título viral, o qual foi feito utilizando a seguinte fórmula:⁶⁸

$$\text{Título viral (UI/mL)} = \frac{\% \text{ células GFP}^+ \times \text{Núm de células transduzidas} \times 1000}{\text{Volume de meio contendo vírions (}\mu\text{L)}}$$

3.32. Geração de ADSCs e HUVECs expressando FVIII e GFP

Para a indução da expressão de FVIII e GFP, as ADSCs e HUVECs foram transduzidas com os vírions carreadores do vetor pCMV-FVIIIΔB-IRES-GFP. Para isso, tanto as ADSCs como as HUVECs foram incubadas com 1 partícula infectante por célula (MOI = 1) e 8 µg/mL de polibreno, adicionados aos seus respectivos meios de cultura. Após 18 horas de incubação, o meio foi substituído e as células foram cultivadas por mais 48 h. Após este período, as ADSCs e HUVECs foram avaliadas quanto à expressão de GFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Além disso, os sobrenadantes destas células foram avaliados quanto à atividade biológica do FVIII por meio do ensaio cromogênico utilizando o kit Chromogenix (Diapharma).

3.33. Avaliação da matriz de colágeno suplementada com fibronectina e FGF-2 na sobrevida das HUVECs *in vitro*

Para o preparo de 1 mL de matriz de colágeno contendo fibronectina humana recombinante e FGF-2, foram misturados primeiramente 310 µL de H₂O deionizada, 60 µL de NaOH 10 mM, 100 µL de meio DMEM-high glucose 10X, 100 µL de fibronectina humana recombinante a 1 mg/mL e 330 µL da mesma solução de colágeno tipo I. Após a homogeneização da mistura e neutralização do pH (visualizado pela coloração rosada devido à presença de vermelho fenol no meio DMEM), foram adicionados 100 µL de solução contendo 1 µg/mL de FGF-2 recombinante humano. Portanto, as concentrações finais de fibronectina e FGF-2 no gel foram 100 µg/mL e 100 ng/mL, respectivamente.

Para avaliar o efeito de cada componente da matriz na sobrevida das HUVECs, foram preparados géis de colágeno tipo I suplementados apenas com fibronectina, apenas com FGF-2 ou com ambos os compostos. Em seguida, 2×10^4 HUVEC^{luc} foram misturadas a 100 µL de cada gel em triplicatas, adicionadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 45 min para polimerizar. Após a polimerização, os géis foram

recobertos com MRFC para induzir a morte das HUVEC^{luc}. Como controle positivo, HUVEC^{luc} embebidas em gel contendo apenas colágeno tipo I foram recobertas com EGM-2.

Após 48 h, as amostras foram submetidas ao PIBB *in vitro* para estimar a quantidade de células viáveis com base na intensidade da bioluminescência emitida.

3.34. Transplante de ADSC-EGM^{FVIII-GFP}, HUVEC^{FVIII-GFP} e SK-HEP^{FVIII-GFP-luc}

Transplante das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP}: cada inóculo foi preparado misturando-se 2×10^6 ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e 2×10^6 HUVEC^{FVIII-GFP} em 300 μ L de hidrogel contendo 3 mg/mL de colágeno tipo I ou em 300 μ L de hidrogel contendo 3 mg/mL de colágeno tipo I, 100 μ g/mL de fibronectina e 100 ng/mL de FGF-2. Em seguida, cada inóculo foi transplantado em dois ou quatro pontos no dorso de camundongos SCID/F8.

Transplante das SK-HEP^{FVIII-GFP-luc}: cada inóculo foi preparado misturando-se 2×10^6 SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} em 20 μ L de hidrogel contendo 3 mg/mL de colágeno tipo I, 100 μ g/mL de fibronectina e 100 ng/mL de FGF-2. Um grupo de animais SCID/F8 ($n = 5$) foi transplantado via injeção subcutânea em duas regiões do dorso e outro grupo ($n = 3$) foi transplantado via injeção intra-hepática em duas regiões do fígado. O animal 1 do grupo do transplante intra-hepático foi inoculado em uma região profunda (~ 5 mm da superfície) do fígado, no parênquima hepático. No entanto, houve refluxo de células durante este procedimento. Para os outros 2 animais, a agulha foi introduzida próxima à interface entre o parênquima e a cápsula do fígado, paralela à superfície do órgão, e as células foram implantadas no espaço subcapsular.

3.35. Avaliação da atividade biológica do FVIII no plasma

Para a avaliação da atividade biológica do FVIII no plasma, os animais foram puncionados na veia facial com uma lanceta de 4 mm para a coleta de 90 μ L de sangue, que foi imediatamente misturado com 10 μ L de solução de citrato de sódio 3,2%. Para a separação do plasma, as amostras foram centrifugadas a 900 *g* durante 20 min a 4 °C. As amostras de plasma foram imediatamente congeladas à -80 °C até seu uso.

A atividade biológica do FVIII das amostras de plasma foi determinada utilizando-se o kit Chromogenix FVIII (Diapharma), seguindo as instruções do fabricante. As curvas padrão foram construídas com um plasma humano referência (SARP, Helena Laboratories) para detecção do FVIII humano, ou com um *pool* de plasma de camundongos C57BL/6J ($n = 5$ animais) para detecção do FVIII murino. Portanto, os valores da atividade biológica do FVIII murino estão expressos como a porcentagem da atividade detectada no plasma de camundongos C57BL/6J.

3.36. Colorações de hematoxilina e eosina e sirius red

Para a coloração com hematoxilina e eosina, cortes de tecido congelados e fixados com solução de formaldeído 3,7% foram primeiramente imersos em PBS por 10 min à TA para a remoção do meio de congelamento. Em seguida, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 1 min e lavadas em água corrente por ~2 min, até a remoção do excesso de corante. Após a lavagem, as células foram imersas em eosina por 2 min e novamente lavadas em água corrente para a remoção do excesso de corante. Por fim, as lâminas foram rapidamente imersas em etanol absoluto, secadas à TA por 5 min e montadas em ERV-mount (EasyPath).

Para a coloração de sirius red, as lâminas foram incubadas em solução contendo 1 mg/mL de Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico (1,3%) durante 1 h à TA. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água deionizada até a remoção do excesso de corante, mergulhadas 3 vezes em etanol absoluto, 1 vez em xilol e montadas em ERV-mount.

3.37. Imunofluorescência e microscopia confocal

Para a marcação dos organóides ectópicos, secções histológicas com 7 µm de espessura foram imersas em PBS durante 10 min à TA para a remoção do meio de congelamento. Já as células cultivadas em lamínulas foram lavadas com PBS 2 vezes e submetidas ao restante do protocolo de marcação.

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% por 10 min à TA e incubadas em solução de PBS-glicina 0,1M. Para a marcação intracelular da luciferase, os espécimes foram permeabilizados em solução de TritonX-100 0,2% (Sigma-Aldrich) durante 10 min à TA. As amostras destinadas à marcação dos antígenos de superfície celular CD31 e CD90 não foram permeabilizadas. Em seguida, as amostras foram incubadas em solução de bloqueio contendo albumina sérica bovina (BSA) 2% em PBS durante 1 h à TA.

Para a marcação das proteínas de interesse, as amostras foram incubadas com 10 µg/mL dos anticorpos anti-CD31 humano, anti-CD31 de camundongo, Anti-CD34 humano, anti-CD90 humano e anti-luciferase em solução de PBS + 2% BSA durante 1 h à TA. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com 10 µg/mL dos anticorpos secundários em solução de PBS + 2% BSA durante 1 h, no escuro, à TA.

Para a marcação dos núcleos, os espécimes foram incubados em 0,75 mg/mL de DAPI (dihidrocloreto de 4,6 diamino-2-fenilindol, Abbott Molecular) durante 10 min, no escuro, à TA. Por fim, as lâminas ou lamínulas foram lavadas em PBS e água deionizada e montadas em Fluormount G (Electron Microscopy Sciences).

Os espécimes foram analisados em um microscópio confocal LSM 710 (Carls Zeiss). As imagens dos co-cultivos de ADSCs e HUVECs consistem em renderizações de 5

imagens obtidas de diferentes planos. As demais imagens consistem em capturas simples de um plano.

3.38. Análises estatísticas

Os dados estão apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão. Os gráficos e os testes estatísticos indicados em cada experimento foram feitos com o auxílio do programa Prism[®] 6.0. Consideramos que houve diferença entre as médias comparadas quando $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo humano

Após a digestão enzimática do tecido adiposo com collagenase IA seguida por centrifugação, os adipócitos e lipídeos livres localizaram-se na fração sobrenadante das amostras, e, assim, foram separados do precipitado celular que constitui a fração estromal vascular (FEV) (**figura 3A**). Após filtração da FEV para a remoção de fragmentos de tecido não digeridos, a composição celular das amostras foi analisada por citometria de fluxo. Com base na quantificação de células expressando o marcador pan-hematopoético CD45 e o marcador de células endoteliais CD31, constatamos que a FEV era uma população heterogênea de células composta por ~60% de células estromais (CD45⁻CD31⁻), ~35% de células hematopoéticas (sendo ~10% de células CD45⁺CD31⁻ e ~25% de células CD45⁺CD31⁺) e ~5% de células endoteliais (CD45⁻CD31⁺) (**figura 3B, C**). Em seguida, estas populações foram avaliadas quanto à expressão de CD34. Todas as células estromais do tecido adiposo, as células endoteliais e a subpopulação de células hematopoéticas CD45⁺CD31⁺ expressavam CD34 (>95% de células positivas). Por outro lado, a subpopulação de células hematopoéticas CD45⁺CD31⁻ apresentou apenas 11% de células positivas para este marcador (**figura 3D**).

Figura 3: Composição celular da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo humano. (A) Separação da FEV após digestão com collagenase seguida de centrifugação. **(B)** Análise da expressão de CD45 e CD31 pelas células da FEV feita por citometria de fluxo. A FEV é composta por três subpopulações celulares fenotipicamente distintas: células estromais (CD45⁻CD31⁻), células hematopoéticas (CD45⁺CD31⁻ e CD45⁺CD31⁺) e células endoteliais (CD45⁻CD31⁺). **(C)** Frequência das subpopulações celulares da FEV

discriminadas pela expressão diferencial de CD45 e CD31. A FEV era composta por ~60% de células estromais, ~35% de células hematopoéticas, sendo ~10% CD45⁺CD31⁻ e ~25% CD45⁺CD31⁺, e por ~5% de células endoteliais. **(D)** Expressão de CD34 nas subpopulações da FEV. As células estromais, as células endoteliais e a subpopulação de células hematopoéticas CD45⁺CD31⁺ eram positivas para CD34, ao passo que a subpopulação de células hematopoéticas CD45⁺CD31⁻ possuía apenas 11% de células positivas para CD34. Estes resultados são referentes a uma amostra representativa.

4.2. As células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs) têm baixa capacidade proliferativa *in vitro*

Em princípio, buscamos isolar as células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs) para serem utilizadas na formação dos organoides vascularizados. No entanto, conforme apresentado anteriormente, a porcentagem de células endoteliais (CD31⁺CD45⁻) na FEV após a digestão do tecido adiposo era baixa (~5%), sobretudo considerando a alta vascularização do referido tecido. Observamos que as amostras retidas nos filtros durante o processamento do tecido adiposo continham diversos fragmentos de vasos sanguíneos (**figura 4A**, painel superior, setas). Assim, a baixa quantidade de células endoteliais presentes na FEV poderia ser devido à retenção destes fragmentos de vasos sanguíneos após a filtração das amostras. Para recuperar as células endoteliais, as amostras retidas nos filtros foram submetidas à digestão com tripsina, e observamos que este procedimento foi suficiente para dissociar os fragmentos de vasos sanguíneos em suas células constituintes (**figura 4A**, painel inferior).

Assim, a dissociação dos vasos sanguíneos com tripsina foi utilizada para a obtenção das CEVs. Para isso, a FEV foi filtrada sequencialmente em filtros com poros de 100 e 45 µm de diâmetro e todas as frações retidas nos filtros foram digeridas com tripsina (**figura 4B**). Com este procedimento, a frequência de CEVs CD31⁺CD45⁻ nas amostras foi quintuplicada, passando de ~5% (**figura 4C**, painel superior) para ~25% (**figura 4C**, painel inferior).

Figura 4: Processamento da FEV para obtenção de células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs). (A) Fotomicrografias de contraste de fase demonstrando a presença de fragmentos de vasos sanguíneos nas amostras de FEV retidas nos filtros (painel superior, setas). Após digestão das amostras com tripsina, os fragmentos de vasos sanguíneos foram dissociados em suas células constituintes (painel inferior). Escala = 20 µm. (B) Procedimento para obtenção de uma população celular enriquecida de CEVs a partir da FEV do tecido adiposo. (C) Análise por citometria de fluxo das populações celulares 1) filtrada e não digerida (painel superior) e 2) retida nos filtros e digerida com tripsina (painel inferior). A digestão com tripsina das amostras retidas nos filtros resultou em um aumento de ~5 vezes na frequência de CEVs CD31⁺CD45⁻. Dados referentes à uma amostra representativa.

Em seguida, tanto a população celular digerida com tripsina quanto a população não digerida foram cultivadas durante 48 h para eliminação de células mortas e não aderentes (e.g. linfócitos, neutrófilos, etc.). Após este período, as células aderentes foram submetidas à seleção imunomagnética de células CD31⁺ para o isolamento das CEVs.

Antes da seleção imunomagnética, a população de células aderentes era composta por 29% de CEVs CD31⁺ (**figura 5A**, histograma vazado). Imediatamente após a seleção, a frequência de CEVs aumentou para 91% (**figura 5A**, histograma cinza), demonstrando a eficiência do procedimento. Em cultura, as CEVs apresentaram uma morfologia poligonal típica de células endoteliais e praticamente todas as células (97%) expressavam CD31 (**figura 5B, C**). Contudo, após a quarta passagem, as CEVs deixaram de proliferar. Por esta razão, o uso de CEVs para modificação gênica e transplante *in vivo* foi inviabilizado pela impossibilidade de expandir o número das referidas células em cultura por mais de 4-5 passagens.

Figura 5: Isolamento e caracterização de células endoteliais vasculares do tecido adiposo (CEVs). **(A)** Histograma demonstrando a porcentagem de células CD31⁺ na FEV antes (histograma vazado) e imediatamente após (histograma cinza) a seleção imunomagnética. **(B)** Fotomicrografia de contraste-de-fase demonstrando o formato poligonal das CEVs. **(C)** Frequência de células CD31 na população de CEVs após três passagens. Praticamente todas as células expressavam CD31 (histograma cinza = isotipo controle; histograma preto = células marcadas com anticorpo anti-CD31).

Como fonte alternativa de células endoteliais, utilizamos as células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs), as quais possuíam a morfologia poligonal típica de células endoteliais cultivadas (**figura 6A**), além de serem positivas para CD31 e negativas para o marcador expresso por células mesenquimais CD90, conforme avaliado por citometria de fluxo (**figura 6B**).

Figura 6: Caracterização das células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs). **(A)** Fotomicrografia de contraste-de-fase demonstrando a morfologia poligonal das HUVECs cultivadas. **(B)** Análise

por citometria de fluxo da expressão de CD31 e CD90 nas HUVECs. Todas as HUVECs eram positivas para o marcador de células endoteliais CD31, ao passo que não expressavam o marcador de células mesenquimais CD90.

4.3. Caracterização das células estromais do tecido adiposo (ADSCs)

As ADSCs foram inicialmente obtidas a partir do cultivo das células da FEV em meio α MEM + 15% SFB. As ADSCs puderam ser identificadas logo nos primeiros dias de cultivo, quando já compunham uma população celular morfológicamente uniforme composta apenas por células fibroblásticas (**figura 7A**). Após 3 passagens em cultura (15 dias), as ADSCs não expressavam os marcadores de células endoteliais e hematopoéticas CD31 e CD45, respectivamente, ao passo que expressavam os marcadores associados à células estromais CD44, CD90, CD140b e outros associados à células perivasculares, como o CD146 e NG2 (**figura 7B**). Apesar de todas as células estromais do tecido adiposo expressarem CD34 (**figura 3D**), as ADSCs perderam a expressão do referido marcador após o cultivo celular (**figura 7B**).

A multipotencialidade das ADSCs *in vitro* foi avaliada após cultivo em meios indutores de diferenciação adipogênica ou osteogênica. Após a indução da adipogênese por 21 dias, parte das ADSCs foi capaz de acumular vesículas lipídicas intracelulares, as quais foram coradas em vermelho com o corante *oil red O* (**figura 7C**, painel ii). Após a indução das osteogênese por 30 dias, uma fração das ADSCs também foi capaz de secretar matriz extracelular calcificada, visualizada em vermelho após a coloração com vermelho de alizarina (**figura 7C**, painel iv). ADSCs mantidas sem os compostos indutores de diferenciação não foram capazes de se diferenciar (**figura 7C**, painéis i e iii).

Figura 7: Caracterização das células estromais do tecido adiposo (ADSCs). **(A)** Morfologia fibroblástica das ADSCs após 4 dias (esquerda) e 3 passagens/15 dias de cultivo (direita). **(B)** Perfil de expressão de moléculas de superfície celular pelas ADSCs. As ADSCs não expressavam os marcadores de células endoteliais e hematopoéticas CD31 e CD45, respectivamente, ao passo que eram positivas para os marcadores de células estromais e/ou perivasculares CD44, CD90, CD140b, CD146 e NG2. A expressão de CD34 foi perdida após o cultivo das ADSCs. Histograma vazado = isotipo controle; histograma cinza = fluorescência das células marcadas com os respectivos anticorpos. **(C)** Diferenciação adipogênica e osteogênica após cultivo em meios indutores. Após 21 dias de indução da adipogênese, parte das ADSCs produziu vesículas lipídicas coradas em vermelho após incubação com *oil red O* (ii). Após indução da osteogênese por 30 dias, parte das ADSCs foi capaz de depositar matriz extracelular mineralizada, visualizada em vermelho após coloração com vermelho de alizarina (iv). ADSCs mantidas em meio sem moléculas indutoras de diferenciação não produziram vesículas lipídicas ou matriz extracelular calcificada (i e iii).

4.4. Cultivo em meio pró-angiogênico aumenta a eficiência clonogênica, a proliferação e a capacidade de diferenciação *in vitro* das ADSCs

A diferenciação de apenas parte das ADSCs após indução de adipogênese e osteogênese *in vitro* reforça observações anteriores de que o cultivo das ADSCs utilizando os métodos convencionais (suplementação do meio de cultivo com 10-15% de SFB) resulta na deterioração de seu potencial de diferenciação.⁵⁸ Assim, considerando que a formação do tecido adiposo é precedida por uma extensa angiogênese acompanhada pela proliferação das ADSCs perivasculares, investigamos se o cultivo de ADSCs em meio pró-angiogênico preservaria suas propriedades progenitoras *in vitro*.

Para tanto, as ADSCs foram cultivadas desde seu isolamento em um meio comercial para crescimento de células endoteliais (EGM-2), o qual é suplementado com 4 fatores de crescimento angiogênicos: fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1). Para fins de comparação, ADSCs obtidas do mesmo paciente foram cultivadas utilizando duas formulações de meio convencionais: DMEM + 10% SFB (referida como DMEM), que é a mais empregada no cultivo de ADSCs (**tabela 5**), e α MEM + 15% de SFB (referida como α MEM), que é utilizada para expansão de ADSCs por nosso grupo de pesquisa e alguns outros.

Tabela 5: Meios mais utilizados para o cultivo de ADSCs.

Meio de cultivo	Referência
DMEM + 10% SFB	51
DMEM + 10% SFB	70
DMEM + 10% SFB	71
DMEM + 10% SFB	72
DMEM + 20% SFB	73
DMEM/F12 + 10% SFB	74
DMEM/F12 + 10% SFB	75
DMEM/F12 + 10% SFB	76

DMEM/F12 + 10% SFB	77
DMEM/F12 + 10% SFB	78
EBM-2 + 2% SFB	79
EGM-2 MV	80
EGM-2 MV	81
LM + 1% soro humano	82
LM + 1% soro humano	83
α MEM + 10% SFB	84
α MEM + 10% SFB	85
α MEM + 10% SFB	86
α MEM + 10% SFB	87
α MEM + 15% SFB	88

Imediatamente após o isolamento, células da FEV foram plaqueadas em baixa densidade (~ 18 células/cm²) nos três diferentes meios e o número resultante de colônias de células fibroblásticas após 14 dias foi usado para avaliar a eficiência clonogênica das ADSCs.

A frequência de colônias formadas em relação ao número de células plaqueadas foi $3,86\% \pm 0,46\%$ para as células mantidas em EGM-2. Este valor foi o dobro do observado para as células mantidas em α MEM ($1,90\% \pm 0,26\%$, $p = 0,006$) e ~ 30 vezes o valor observado para as células mantidas em DMEM ($0,13\% \pm 0,06\%$, $p < 0,0001$) (**figura 8**).

Figura 8: Efeito do meio EGM-2 na eficiência clonogênica das ADSCs. (A) Placas de cultivo representativas contendo colônias de ADSCs coradas com corante de Leishman (regiões azuis) 19 dias após o plaqueamento. (B) Quantificação da eficiência clonogênica das células da FEV nos três meios de cultivo. O cultivo em meio EGM-2 resultou na maior eficiência clonogênica, seguido pelas células mantidas em α MEM e DMEM, respectivamente ($n = 3$; $*p < 0,01$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

Em seguida, avaliamos o efeito do cultivo em EGM-2 na proliferação das ADSCs. Para tanto, ADSCs mantidas desde seu isolamento nos três diferentes meios foram monitoradas durante 31 dias quanto ao número de duplicações e o tempo de duplicação celular.

As ADSCs cultivadas em meio EGM-2 apresentaram a maior velocidade de proliferação, seguida pelas células cultivadas em α MEM e DMEM, respectivamente, conforme demonstrado pelo cálculo da área sob as curvas de crescimento (**figura 9A, B**). O tempo médio de duplicação celular durante as 3 primeiras passagens das ADSCs mantidas em EGM-2 foi $21,7 \text{ h} \pm 5,2 \text{ h}$, sendo superior ao das ADSCs cultivadas em α MEM ($35,8 \text{ h} \pm 7,7 \text{ h}$, $p < 0,0001$) ou em DMEM ($54,4 \text{ h} \pm 3,8 \text{ h}$, $p < 0,0001$).

A proliferação mais rápida das ADSCs em EGM-2 também antecipou o aparecimento de indícios de exaustão proliferativa em comparação aos demais meios. Isto pode ser notado pela atenuação da inclinação da curva de crescimento após 3 passagens do início do monitoramento (**figura 9A**).

Figura 9: Efeito de diferentes meios de cultivo na proliferação das ADSCs. (A) Cinética de proliferação das ADSCs ao longo de 31 dias em cultura. O cultivo em EGM-2 resultou na maior velocidade de proliferação das ADSCs, seguido pelo cultivo em α MEM e DMEM, respectivamente. **(B)** Quantificação da velocidade de duplicação por meio do cálculo da área sob as curvas de proliferação, confirmando o efeito mitogênico do meio EGM-2 sobre as ADSCs ($n = 3$, $*p < 0,05$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

Em seguida, avaliamos o efeito do cultivo em EGM-2 na multipotencialidade das ADSCs *in vitro*. Para tanto, as ADSCs foram pré-cultivadas por 2 passagens desde seu isolamento nos três diferentes meios e então incubadas nos meios indutores de adipogênese e osteogênese.

Após a indução da adipogênese por 15 dias, praticamente todas as ADSCs cultivadas em EGM-2 foram capazes de acumular vesículas lipídicas no citoplasma, conforme evidenciado após coloração com *oil red O* (Figura 10A). Em contrapartida,

apenas parte das ADSCs cultivadas em α MEM ou DMEM produziram vesículas lipídicas (**figura 10A**). A quantificação do corante *oil red O* por densitometria óptica demonstrou que as ADSCs cultivadas em EGM-2 tiveram o maior potencial adipogênico, seguidas pelas ADSCs mantidas em α MEM e DMEM, respectivamente (**figura 10B**).

Assim como observado para a diferenciação adipogênica, as ADSCs cultivadas em EGM-2 foram capazes de sintetizar a maior quantidade de matriz extracelular calcificada, seguidas pelas ADSCs cultivadas em α MEM e DMEM, respectivamente (**figura 10C**). Estes resultados também foram confirmados pela quantificação da coloração de vermelho de alizarina por densitometria óptica (**figura 10D**).

Figura 10: Cultivo em meio EGM-2 aumenta o potencial de diferenciação *in vitro* das ADSCs. (A) Coloração das ADSCs com o corante *oil red O* 15 dias após a indução da adipogênese. As ADSCs cultivadas em EGM-2 foram capazes de acumular mais vesículas lipídicas (coradas em vermelho) do que as cultivadas nos demais meios (painéis inferiores). ADSCs mantidas sem os compostos indutores de diferenciação não produziram vesículas lipídicas (painéis superiores). Contra-coloração: hematoxilina de Harris. (B) Quantificação do corante *oil red O* por densitometria óptica. As ADSCs cultivadas em EGM-2 apresentaram diferenciação adipogênica mais eficiente, seguidas pelas ADSCs cultivadas em α MEM e DMEM, respectivamente ($n = 3$, $*p < 0,05$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey). (C) Coloração das ADSCs com o corante vermelho de alizarina 30 dias após a indução da osteogênese. As ADSCs cultivadas em EGM-2 foram capazes de sintetizar mais matriz extracelular calcificada (corada em vermelho) do que as cultivadas nos demais meios (painéis inferiores). ADSCs mantidas sem os compostos indutores de diferenciação não produziram matriz extracelular calcificada (painéis superiores). (D) Quantificação do corante vermelho de alizarina por densitometria óptica. As ADSCs cultivadas em EGM-2 apresentaram diferenciação osteogênica mais eficiente, seguidas pelas ADSCs cultivadas em α MEM e DMEM, respectivamente ($n = 3$, $*p < 0,05$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.5. O cultivo em EGM-2 aumenta a transcrição de genes que desencadeiam a adipogênese e osteogênese e não altera a transcrição do gene que codifica a telomerase

Após observarmos os efeitos do cultivo em EGM-2 sobre a proliferação e diferenciação das ADSCs *in vitro*, avaliamos se o fenótipo observado correlacionava-se com alterações na transcrição de genes relacionados à adipogênese, osteogênese e à manutenção dos telômeros. Para isso, as ADSCs foram cultivadas nos três diferentes meios durante 2 passagens e a transcrição dos genes selecionados foi avaliada por PCR quantitativa (qPCR).

A transcrição dos genes codificantes do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (*PPAR γ*) e da proteína ligante de ácido graxo 4 (*FABP4*), ambos essenciais para indução da adipogênese, estava aumentada pelo menos 16 vezes ($p = 0,0003$) e 700 vezes ($p = 0,0001$), respectivamente, em relação às ADSCs mantidas em α MEM ou DMEM (**figura 11**). As ADSCs não expressavam os genes adiponectina (*ADIPOQ*) e leptina (*LEP*), os quais são característicos das fases tardias da adipogênese. Dentre os genes envolvidos na osteogênese, as ADSCs cultivadas em EGM-2 apresentaram uma expressão do fator de transcrição *RUNX2* 30% maior em relação às células mantidas em α MEM ($p = 0,002$) e 8 vezes maior em relação às células cultivadas em DMEM ($p < 0,0001$). Conforme esperado, as ADSCs expressavam altos níveis de osteonectina (*SPARC*) e não expressavam osteocalcina (*BGLAP*), a qual é tipicamente expressa nas etapas finais da osteogênese (**figura 11**). Estes resultados demonstram que o cultivo em EGM-2 eleva a expressão de genes essenciais para a iniciação da adipogênese e osteogênese.

A despeito do efeito pró-mitogênico do EGM-2, nenhuma das ADSCs expressava o gene codificante da enzima telomerase (*TERT*), o qual é responsável pela manutenção dos telômeros durante a duplicação do DNA (**figura 11**).

Figura 11: Expressão gênica das ADSCs avaliada por qPCR. O cultivo das ADSCs em EGM-2 elevou a expressão dos genes *PPARγ* e *FABP4*, ambos importantes para a iniciação da adipogênese e do gene *RUNX2*, essencial para a diferenciação osteogênica. As ADSCs não expressavam genes característicos das fases tardias da adipogênese (*ADIPOQ* e *LEP*) e da osteogênese (*BGLAP*). Além disso, as ADSCs não expressavam o gene codificante da enzima telomerase (*TERT*) ($n = 2$, $*p < 0,0025$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.6. O meio de cultivo causa pequenas alterações no perfil imunofenotípico das ADSCs

Após verificarmos que as ADSCs cultivadas nos diferentes meios apresentam potencial clonogênico, proliferativo e de diferenciação distintos, avaliamos se estas diferenças funcionais estavam associadas à alterações na expressão dos principais marcadores de superfície celular usados na identificação das ADSCs. Para isso, ADSCs cultivadas em EGM-2, αMEM e DMEM durante três passagens foram caracterizadas quanto à expressão de 16 proteínas de superfície celular por citometria de fluxo.

Conforme sumarizado na **tabela 6**, ADSCs cultivadas nos três diferentes meios possuíam um perfil imunofenotípico similar para a maioria dos marcadores avaliados.

Tabela 6 Expressão de moléculas de superfície em ADSCs cultivadas nos meios EGM-2, αMEM e DMEM. Os valores representam a frequência de células positivas para cada marcador.

Marcador	EGM-2	αMEM	DMEM
CD45	0,00%	0,00%	0,17%
CD271	0,00%	17,38%	0,43%
CD24	0,00%	0,34%	0,07%
CD144	0,01%	0,03%	0,04%
CD34	0,17%	1,09%	15,50%
CD117	0,57%	0,00%	0,17%
CD31	1,02%	0,04%	0,08%
KDR	1,21%	3,31%	0,65%
CD146	5,03%	75,18%	0,06%

CD140 α	88,14%	83,98%	3,81%
NG2	93,54%	95,28%	1,16%
CD90	99,22%	99,48%	98,89%
CD73	99,24%	99,78%	90,30%
CD105	99,35%	99,84%	98,70%
CD44	99,63%	99,76%	98,95%
CD140 β	99,75%	99,74%	95,80%

Para avaliar quantitativamente a semelhança entre os perfis imunofenotípicos das ADSCs, a frequência de células positivas para a cada marcador foi inicialmente plotadas em gráficos de dispersão de modo que as condições de cultivo fossem comparadas duas a duas (**figura 12A**). Esta análise evidenciou que a expressão diferencial dos marcadores de células perivasculares CD146, CD140 α e NG2 é um atributo que distingue as ADSCs cultivadas nos três diferentes meios. Ao passo que as ADSCs cultivadas em DMEM não expressaram estes três marcadores, todos eles estavam presentes nas células cultivadas em α MEM. As ADSCs mantidas em EGM-2, por sua vez, expressaram CD140 α e NG2, mas não CD146 (**figura 12A**, pontos vermelhos).

Em seguida, realizamos um teste de correlação linear entre os perfis imunofenotípicos. Neste tipo de análise, populações celulares com perfis imunofenotípicos idênticos teriam o coeficiente de correlação "r" igual a 1, ao passo que o mesmo valor tende a zero à medida em que a diferença entre duas populações aumenta. A partir destas análises, concluímos que o perfil imunofenotípico das ADSCs cultivadas em EGM-2 é mais similar ao das mantidas em α MEM ($r = 0,93$) do que àquelas cultivadas em DMEM ($r = 0,79$) (**figura 12B**). Notavelmente, as semelhanças entre os perfis imunofenotípicos parecem refletir as similaridades funcionais entre as ADSCs cultivadas nos diferentes meios. Isto porque, conforme apresentado anteriormente, a eficiência clonogênica, o potencial proliferativo e a capacidade de diferenciação foram maiores nas ADSCs mantidas em EGM-2, seguidas pelas ADSCs cultivadas em α MEM e DMEM, respectivamente.

Figura 12: Análise de similaridade imunofenotípica entre ADSCs cultivadas em diferentes meios. (A) Gráficos de dispersão demonstrando a associação entre a frequência de células positivas para cada marcador. Os pontos em vermelho correspondem aos marcadores CD146, CD140α e NG2, cuja expressão diferencial é capaz de discernir as ADSCs mantidas em cada um dos meios. A linha diagonal tracejada representa o local onde os pontos deveriam aparecer caso a expressão de um dado marcador fosse idêntica entre as duas populações celulares comparadas. **(B)** Tabela com os valores de coeficiente de correlação de Pearson para os perfis imunofenotípicos das ADSCs cultivadas em cada um dos meios. As ADSCs cultivadas em EGM-2 apresentaram um perfil imunofenotípico mais semelhante ao das ADSCs mantidas em αMEM ($r = 0,93$) do que ao das ADSCs cultivadas em DMEM ($r = 0,79$).

4.7. ADSCs sobrevivem ao transplante subcutâneo em matrizes de colágeno tipo I

Após avaliarmos o efeito de diferentes meios de cultivo nas propriedades funcionais das ADSCs, selecionamos apenas as cultivadas em EGM-2 (referidas como ADSC-EGM) ou em αMEM (referidas como ADSC-αMEM) para as etapas subsequentes.

A fim de monitorar a sobrevivência das ADSCs após transplante, as mesmas foram modificadas por transdução lentiviral para expressar a proteína repórter bioluminescente luciferase 2. Após a modificação gênica e seleção das células contendo o transgene, constatamos que as ADSCs passaram a expressar luciferase biologicamente ativa (ADSC-EGM^{luc} = $7,4 \times 10^3 \pm 4,5 \times 10^2$ fótons/s/célula; ADSC-αMEM^{luc} = $7,2 \times 10^3 \pm 3,9 \times 10^2$ fótons/s/célula) e a intensidade de bioluminescência emitida foi diretamente proporcional ao número de células (**figura 13**).

Figura 13: Bioluminescência *in vitro* das ADSCs modificadas para expressar luciferase. Após a transdução com o vetor lentiviral contendo o gene da luciferase 2, as ADSCs passaram a emitir sinal bioluminescente, conforme verificado por processamento de imagem baseado em bioluminescência *in vitro* (painéis superiores). Além disso, a intensidade de bioluminescência (medida em fótons por segundo) foi diretamente proporcional ao número de células nos poços de cultura (gráficos inferiores) ($n = 2$, teste de regressão linear).

Para a realização dos transplantes, 5×10^5 ADSC-EGM^{luc} ou ADSC-αMEM^{luc} foram suspensas em hidrogéis de colágeno tipo I e injetadas subcutaneamente no flanco esquerdo de camundongos NSG. Além disso, suspensões contendo uma mistura de 5×10^5 ADSC-EGM^{luc} ou ADSC-αMEM^{luc} com 5×10^5 HUVECs em colágeno foram transplantadas no flanco direito dos mesmos animais. A bioluminescência foi monitorada durante 30 dias após o transplante a fim de avaliarmos a sobrevida das ADSC^{luc} transplantadas sozinhas ou na presença de HUVECs.

As análises por processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) *in vivo* demonstraram que as ADSCs sobreviveram ao transplante após 30 dias (**figura 14A**). Além disso, a cinética de sobrevida das ADSCs foi similar independentemente do meio de cultivo utilizado ou da presença de HUVECs nos implantes, uma vez que não houve diferença na área média sob as curvas relativas à bioluminescência emitida ao longo dos 30 dias pós-transplante ($p = 0,07$, one-way ANOVA) (Figura 14B).

Figura 14: Rastreamento das ADSC^{luc} transplantadas *in vivo*. (A) Suspensões em colágeno contendo apenas ADSC^{luc} foram injetadas subcutaneamente no flanco esquerdo dos camundongos. No flanco direito foram injetadas misturas contendo ADSC^{luc} e HUVECs. A detecção de bioluminescência nas regiões de infusão demonstra que as ADSC^{luc} sobreviveram ao transplante. (B) Quantificação da bioluminescência emitida pelas ADSC^{luc} durante 30 dias após transplante. A sobrevivência das ADSCs foi similar independentemente do meio de cultivo e da presença de HUVECs (n = 4 animais por grupo, p = 0,07, one-way ANOVA).

4.8. Caracterização dos organoides gerados após o transplante de ADSCs e HUVECs

Após o monitoramento da bioluminescência *in vivo*, os organoides gerados após transplante foram removidos e caracterizados.

Os organoides gerados pela co-infusão de ADSCs e HUVECs apresentaram coloração avermelhada, sugerindo maior perfusão sanguínea (figura 15, painéis esquerdos). Para confirmar se as HUVECs haviam enxertado nos organoides, investigamos a presença de células endoteliais humanas utilizando anticorpos anti-CD31 humano. Simultaneamente, também utilizamos anticorpos anti-CD31 de camundongos para investigar a presença de células endoteliais originárias do animal receptor.

As análises por microscopia confocal demonstraram que os organoides gerados pela infusão de ADSC-αMEM^{luc} ou ADSC-EGM^{luc} sozinhas eram avascularizados, uma vez que não foram detectadas células endoteliais CD31⁺ em quaisquer das amostras (Figura 15). Por outro lado, as HUVECs co-transplantadas com ADSC-αMEM^{luc} ou ADSC-EGM^{luc} enxertaram nos organoides e organizaram-se em vasos sanguíneos (figura 15). Não foram encontradas células endoteliais murinas no interior dos organoides, mas apenas no tecido circunjacente pertencente aos animais receptores (figura 15, seta).

Figura 15: Identificação de HUVECs e células endoteliais murinas nos organóides. Os painéis à esquerda correspondem às fotografias dos organóides removidos após 60 dias do transplante. Os organóides gerados pela co-infusão de ADSCs e HUVECs apresentaram uma coloração avermelhada, indicando maior perfusão sanguínea do que os implantes gerados pela infusão de ADSCs sozinhas. Os painéis à direita demonstram a marcação com anti-CD31 humano (para identificação das HUVECs) e com anti-CD31 de camundongo, para identificar células endoteliais do animal receptor. Os implantes gerados pela infusão de ADSC-αMEM^{luc} ou ADSC-EGM^{luc} sozinhas eram avascularizados. Por outro lado, os implantes gerados pela co-infusão de ADSCs e HUVECs apresentaram vasos sanguíneos de origem humana. Células endoteliais murinas só foram identificadas no tecido do animal receptor adjacente (setas).

Sabe-se que as células estromais do tecido adiposo, incluindo as ADSCs, expressam CD34 *in vivo*, o que foi confirmado neste estudo após a caracterização imunofenotípica das células que compõem a FEV (**figura 3D**). Entretanto, a expressão de CD34 é perdida durante o cultivo, independentemente da utilização de meio EGM-2 ou αMEM (**figura 16A**). Tendo em vista que o cultivo celular não recapitula a topografia e as interações que ocorrem *in vivo*, investigamos se as ADSCs cultivadas em ambos os meios seriam capazes de recuperar características nativas, como a expressão de CD34, após transplante. Para tanto, os organóides gerados pela infusão de ADSC-EGM^{luc} ou ADSC-αMEM^{luc} foram marcados simultaneamente com anticorpos anti-CD34 e anti-luciferase.

As análises por microscopia confocal demonstraram que as ADSC-EGM^{luc} recuperaram a expressão de CD34 *in vivo* (**figura 16B**, painéis superiores). Ao contrário, as ADSC-αMEM^{luc} não re-expressaram o referido marcador (**figura 16B**, painéis

inferiores). Estes dados indicam que o cultivo das ADSCs em condições convencionais (como o meio α MEM suplementado com SFB) leva à perda irreversível de características nativas das ADSCs, como a expressão de CD34.

Em seguida, os organóides foram caracterizados quanto à composição histológica e quanto ao tipo predominante de matriz extracelular utilizando técnicas de coloração convencionais.

Após a coloração com hematoxilina e eosina, observamos que não houve diferenciação adipogênica nos organóides gerados pela infusão de ADSCs, independentemente do meio onde foram previamente cultivadas ou da presença de HUVECs. Também não foram identificadas regiões com ossificação ou formação de cartilagem (**figura 17A**). Todos os implantes consistiam em tecido estromal de preenchimento, nos quais as células apareciam distribuídas em uma matriz de colágeno densa, conforme demonstrado após coloração com *Sirius Red*, que cora fibras de colágeno em vermelho (**figura 17B**).

Figura 17: Caracterização histológica dos organóides. (A) Secções histológicas dos organóides coradas com hematoxilina e eosina. Os organóides consistiam em tecido estromal de preenchimento sem regiões de diferenciação adipogênica, condrogênica ou osteogênica. Além disso, somente os implantes contendo HUVECs eram vascularizados. As regiões delimitadas nas imagens superiores (retângulo pontilhado) aparecem ampliadas nas imagens inferiores. (B) Secções histológicas coradas com Sirius Red, evidenciando as fibras de colágeno em vermelho. Esta coloração demonstrou que os implantes consistiam em células dispersas por uma matriz de colágeno. As regiões delimitadas nas imagens superiores (retângulo pontilhado) aparecem ampliadas nas imagens inferiores.

4.9. Matrizes de colágeno tipo I e Matrigel tem efeito oposto sobre a diferenciação adipogênica *in vivo*

Conforme descrito anteriormente, o cultivo em meio EGM-2 aumentou o potencial de diferenciação adipogênica das ADSCs *in vitro*. No entanto, estas células não originaram quaisquer adipócitos após o transplante em matriz densa (3 mg/mL) de colágeno tipo I. Assim, avaliamos se o uso de uma matriz extracelular alternativa ao colágeno tipo I seria capaz de prover as condições necessárias para a adipogênese *in vivo*. Para tanto, transplantamos células não cultivadas da FEV em matriz de colágeno tipo I ou em Matrigel, que consiste em um gel contendo diversas proteínas da membrana basal produzida pela linhagem de células de sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm. Utilizamos células da FEV pois elas retêm o potencial diferenciação adipogênica que é geralmente deteriorado após cultivo.

Para os transplantes, 5×10^5 células da FEV foram adicionadas a um hidrogel de colágeno tipo I ou a uma mistura de Matrigel e PBS (1:1). Em seguida, as suspensões celulares foram injetadas subcutaneamente em camundongos NSG e os implantes foram recuperados após 60 dias para análises histológicas.

Os organoides gerados pela infusão em colágeno tipo I não apresentaram tecido adiposo em quaisquer das amostras analisadas ($n = 3$ organoides). Estes organoides eram compostos por tecido estromal de preenchimento, no qual as células estromais ocupavam uma matriz composta por fibras delgadas presumivelmente de colágeno (**figura 18**, painel esquerdo). Por outro lado, as células da FEV transplantadas em Matrigel formaram um tecido adiposo ectópico delimitado do tecido circunjacente do hospedeiro (**figura 18**, painel direito), o que foi observado em todas as amostras analisadas ($n = 3$ organoides). Estes achados demonstram que a matriz densa de colágeno tipo I impede a diferenciação adipogênica das ADSCs *in vivo*.

Considerando que a ausência de diferenciação adipogênica não impediria o uso das ADSCs como veículo produtor de FVIII *in vivo*, e que o Matrigel não é usado na clínica por ser originado de células tumorais, prosseguimos com os estudos utilizando as matrizes de colágeno tipo I.

Figura 18: Organoides gerados após transplante de células da FEV em colágeno tipo I ou em Matrigel. Células da FEV transplantadas em colágeno tipo I não foram capazes de originar tecido adiposo ectópico (painel esquerdo). Os organóides obtidos deste transplante eram compostos por tecido estromal de preenchimento, nos quais as células apareciam dispersas em uma matriz de fibras de colágeno. Células da FEV transplantadas em Matrigel, por outro lado, originaram tecido adiposo ectópico (painel direito, seta). Coloração: hematoxilina e eosina.

4.10. Pré-cultivo em EGM-2 aumenta a capacidade das ADSCs de proteger HUVECs contra a morte celular causada por privação de fatores de crescimento

As células endoteliais são veículos promissores para a produção do FVIII, uma vez que elas podem secretá-lo diretamente no lúmen dos vasos sanguíneos e são células produtoras do fator de von Willebrand, uma glicoproteína que interage com o FVIII e prolonga sua meia-vida. Assim, caracterizamos o efeito das ADSCs cultivadas em α MEM ou EGM-2 na sobrevivência de HUVECs.

4.10.1. *Privação de fatores de crescimento como modelo para indução de morte celular em HUVECs*

Com o objetivo de estudar o efeito protetivo das ADSCs sobre as HUVECs, inicialmente estabelecemos um modelo capaz de induzir apoptose nas referidas células endoteliais. Este modelo consistiu em cultivar as HUVECs em meio α MEM suplementado com apenas 1% de SFB (referido como MRFC, de meio reduzido de fatores de crescimento) e avaliar a quantidade de células apoptóticas por citometria de fluxo após marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP).

Quando mantidas em meio EGM-2, praticamente todas as HUVECs (>90%) estavam vivas e não haviam ativado a apoptose, já que não eram positivas para os marcadores anexina V e IP (**figura 19**, painel esquerdo). No entanto, 24 h após cultivo em MRFC, ~70% das HUVECs já se apresentavam no estágio de apoptose recente (células Anexina V⁺ IP⁻) (**figura 19**, painel central). Após estendermos o cultivo em MRFC por mais 24 h, a maioria das HUVECs (~62%) já se apresentava na fase de apoptose tardia ou necrose (células Anexina V⁺ IP⁺), caracterizada pela perda da integridade da membrana plasmática, fazendo com que as células tornem-se permeáveis ao IP (**figura 19**, painel direito). Estes dados demonstram que a privação de fatores de crescimento causa uma ativação rápida da apoptose em HUVECs. Portanto, utilizamos o cultivo em MRFC para avaliar o efeito protetivo das ADSCs contra a morte das HUVECs *in vitro*.

Figura 19: Avaliação por citometria de fluxo da apoptose de HUVECs após cultivo em meio reduzido de fatores de crescimento. Poucas HUVECs cultivadas em EGM-2 apresentaram-se no estágio de apoptose recente (Anexina V⁺ IP⁻) ou apoptose tardia/necrose (Anexina V⁺ IP⁺) (painel esquerdo). Após 24 h de cultivo

em meio reduzido de fatores de crescimento (MRFC), a maioria das HUVECs estava no estágio de apoptose recente (painel central). Após mais 24 h de cultivo em MRFC, a maioria das HUVECs progrediu para o estágio de apoptose tardia/necrose (painel direito).

4.10.2. ADSCs pré-cultivadas em EGM-2 provêm maior proteção às HUVECs contra a morte celular induzida pela privação de fatores de crescimento

A fim de facilitar o monitoramento da sobrevivência das HUVECs tanto *in vitro* como *in vivo*, elas foram modificadas geneticamente para expressar luciferase 2. Após a transdução lentiviral e a seleção com puromicina, as HUVEC^{luc} expressaram luciferase biologicamente ativa ($5,4 \times 10^3 \pm 0,76 \times 10^3$ fótons/s/célula) e a bioluminescência emitida era diretamente proporcional ao número de células (**figura 20A, B**).

Figura 20: Bioluminescência das HUVEC^{luc} *in vitro*. (A) Imagem obtida após PIBB *in vitro* demonstrando a intensidade da bioluminescência emitida por diferentes quantidades de HUVEC^{luc}. (B) Gráfico demonstrando que a intensidade da bioluminescência é linearmente e diretamente proporcional ao número de HUVEC^{luc} ($R^2 = 0,99$, teste de regressão linear).

Em seguida, HUVEC^{luc} foram semeadas em placas de 24 poços e, no dia seguinte, quantidades crescentes de ADSC-αMEM ou ADSC-EGM foram adicionadas às HUVEC^{luc} na presença de MRFC. Após 48 h, a sobrevivência das HUVEC^{luc} foi avaliada por PIBB.

De acordo com a quantificação da bioluminescência, o cultivo em MRFC causou a morte de $88\% \pm 2\%$ das HUVEC^{luc} quando comparado ao cultivo em EGM-2 (**figura 21**). Enquanto que as ADSC-αMEM não tiveram efeito na sobrevivência das HUVEC^{luc}, as ADSC-EGM protegeram as referidas células de modo dose-dependente contra a morte induzida pela privação de fatores de crescimento (**figura 21**). Ressalta-se que o efeito protetor das ADSC-EGM foi observado somente nos co-cultivos cuja proporção de ADSC e HUVEC era igual ou maior que 0,5:1 (**figura 21B**).

Figura 21: ADSC-EGM protegem as HUVEC^{luc} contra morte celular causada por privação de fatores de crescimento. (A) Bioluminescência emitida pelas HUVEC^{luc} co-cultivadas com ADSCs após 48 h de privação de fatores de crescimento. (B) Quantificação da bioluminescência demonstrando que as ADSC-EGM protegeram as HUVEC^{luc} contra a morte celular de modo dose-dependente (n = 3, *p < 0,05, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

Em seguida, investigamos se o efeito protetor das ADSC-EGM poderia ser recapitulado por seu secretoma. Para isso, ADSC-αMEM e ADSC-EGM foram cultivadas em MRFC durante 48 h para a geração do meio condicionado. Esta abordagem foi usada para avaliar se as moléculas secretadas pelas ADSCs no MRFC seriam capazes de suprimir seu efeito apoptótico sobre as HUVECs.

O meio condicionado das ADSC-αMEM (αMEM-MC) não teve efeito na sobrevivência das HUVEC^{luc} após 48 h de cultivo, uma vez que a bioluminescência emitida foi similar ao das HUVEC^{luc} cultivadas apenas com MRFC (p = 0,80) (**figura 22A**). Por outro lado, o meio condicionado das ADSC-EGM (EGM-MC) protegeu parcialmente as HUVEC^{luc} contra a morte causada pela privação de fatores de crescimento (**figura 22A**). Estes resultados baseados na quantificação da bioluminescência foram confirmados após a coloração das HUVEC^{luc} aderentes com hematoxilina de Harris (**figura 22B**). Ainda em concordância com estes resultados, apenas o EGM-MC impediu a ativação da apoptose nas HUVEC^{luc} após 48 h de cultivo, conforme constatado após a quantificação de células positivas para anexina V por citometria de fluxo (**figura 22C**).

Figura 22: O secretoma das ADSC-EGM protege as HUVEC^{luc} contra a morte celular induzida por privação de fatores de crescimento. (A) PIBB das HUVEC^{luc} durante cultivo com meio condicionado de ADSCs. A maioria das HUVEC^{luc} mantidas em MRFC morreram em comparação às células cultivadas em EGM-2. No entanto, o meio condicionado de ADSCs pré-cultivadas em EGM-2 (EGM-MC) suprimiu parcialmente a morte das HUVEC^{luc}. Já o meio condicionado das ADSCs pré-cultivadas em αMEM (αMEM-MC) não teve qualquer efeito na sobrevivência das HUVEC^{luc} ($n = 3$, $p < 0,01$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey). **(B)** Coloração das HUVEC^{luc} com hematoxilina de Harris após 48 h de cultivo. As fotomicrografias confirmaram que o EGM-MC foi capaz de suprimir parcialmente a morte celular das HUVEC^{luc} causada pela privação de fatores de crescimento. **(C)** Porcentagem de HUVEC^{luc} apoptóticas (células anexina V⁺) após 48 h de cultivo nos meios condicionados de ADSCs. O EGM-MC impediu a ativação da apoptose nas HUVEC^{luc} após privação de fatores de crescimento ($n = 3$, $p < 0,0001$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.10.3. As ADSC-EGM induzem as HUVEC^{luc} a formar uma rede de cordões endoteliais *in vitro* perante a privação de fatores de crescimento

Além da sobrevivência das células endoteliais, a criação de um organoide vascularizado depende que elas recebam estímulos morfogênicos e motogênicos capazes de induzi-las a se organizar em vasos sanguíneos. Portanto, investigamos se as ADSCs cultivadas nos diferentes meios seriam capazes de estimular a angiogênese em condições adversas, como a privação de fatores de crescimento.

Após o co-cultivo de ADSCs e HUVEC^{luc} em MRFC durante 48 h, conforme reportado anteriormente (**figura 21**), as células foram coradas com hematoxilina de Harris e inspecionadas. Nos co-cultivos contendo HUVEC^{luc} e ADSC-EGM, houve a formação de uma rede de cordões celulares corados fortemente com hematoxilina, presumivelmente compostos pelas HUVEC^{luc}, cuja extensão e ramificação eram proporcionais à quantidade de ADSC-EGM (**figura 23A**, painéis inferiores). Este fenômeno não foi observado nos co-cultivos entre ADSC-αMEM e HUVEC^{luc} (**figura 23A**, painéis superiores). Após inspeção microscópica utilizando maior aumento, observamos que as HUVEC^{luc} cultivadas sozinhas em meio EGM-2 não se organizaram em cordões e cresceram formando uma monocamada (**figura 23B**, painel esquerdo). Por outro lado as

HUVEC^{luc} co-cultivadas com ADSC-EGM formaram cordões compostos por células fusiformes alinhadas e coradas mais fortemente com hematoxilina em relação às células da monocamada circunjacente (**figura 23B**, painel direito). Novamente, os co-cultivos de HUVEC^{luc} com ADSC- α MEM não continham quaisquer sinais de formação destes cordões celulares, mesmo após inspeção com lentes objetivas de maior aumento (**figura 23B**, painel central).

Figura 23: ADSC-EGM estimulam a formação de cordões endoteliais durante co-cultivo com HUVEC^{luc}. (A) Fotomicrografias dos poços após 48 h de co-cultivo entre ADSCs e HUVEC^{luc} em MRFC. As ADSC-EGM induziram presumivelmente as HUVEC^{luc} a formarem uma rede de cordões endoteliais cuja extensão foi proporcional ao número de ADSCs (painéis inferiores). Não houve formação dos cordões endoteliais nos co-cultivos entre ADSC- α MEM e HUVEC^{luc} (painéis superiores). Aumento = 40X. (B) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando os cordões presumivelmente endoteliais formados durante o co-cultivo de ADSC-EGM e HUVEC^{luc} (painel direito). As HUVEC^{luc} sozinhas não se organizaram em cordões (painel esquerdo). Aumento = 400X.

Para discernir entre as ADSCs e as HUVEC^{luc} nos co-cultivos, realizamos a marcação simultânea com anti-CD90 e anti-CD31, proteínas que são expressas exclusivamente pelas ADSCs ou HUVECs, respectivamente, conforme avaliado por citometria de fluxo (**figura 24A**). Após a análise por microscopia confocal, confirmamos que os cordões formados nos co-cultivos com ADSC-EGM eram de fato constituídos pelas HUVEC^{luc} e que a monocamada circunjacente era composta pelas ADSCs CD90⁺ (**figura 24B**, painel direito). No co-cultivo com ADSC- α MEM, identificamos apenas algumas HUVEC^{luc} raras e isoladas (**figura 24B**, painel esquerdo), o que está de acordo com a

sobrevida reduzida destas células quando co-cultivadas com ADSC- α MEM, impossibilitando a formação de cordões endoteliais.

Notavelmente, a julgar pela distribuição dos núcleos das ADSC-EGM, estas localizaram-se mais concentradas junto aos cordões de HUVEC^{luc}, indicando um tropismo em direção às células endoteliais (**figura 24B**, painel direito).

Figura 24: Identificação de ADSCs e HUVEC^{luc} durante co-cultivo direto. (A) Análise por citometria de fluxo demonstrando que as ADSCs, mas não as HUVEC^{luc}, expressam CD90 (painéis superiores). Por outro lado, a expressão de CD31 é restrita às HUVEC^{luc} (painéis inferiores). Histograma vazado: fluorescência do isotipo controle. Histograma cinza = fluorescência das células incubadas com os respectivos anticorpos. (B) Imagens de microscopia confocal demonstrando que os cordões formados durante o co-cultivo com ADSC-EGM contém as HUVEC^{luc} CD31⁺ (painel direito). Após co-cultivo com ADSC- α MEM, apenas algumas raras HUVEC^{luc} CD31⁺ permaneceram aderidas (painel esquerdo). Aumento = 630X.

A exemplo dos experimentos sobre a sobrevida das HUVEC^{luc}, também investigamos se o secretoma das ADSC-EGM poderia recapitular o efeito pró-angiogênico observado nos ensaios de co-cultivo. Para tanto, HUVEC^{luc} foram semeadas sobre Matrigel e incubadas nos meios condicionados de ADSCs por 24 h. Após este período, as culturas foram fotografadas e avaliadas quanto à extensão total dos cordões endoteliais formados.

Quando mantidas em EGM-2, as HUVEC^{luc} organizaram-se em uma rede de cordões, o que é esperado de células endoteliais cultivadas sobre Matrigel na presença de

fatores de crescimento pró-angiogênicos (**figura 25A**). Nos poços contendo MRFC, observamos apenas pequenos fragmentos de cordões endoteliais (**figura 25A**). O comprimento dos cordões endoteliais formados na presença de α MEM-MC foi equivalente ao dos formados pelas células mantidas em MRFC (**figura 25A, B**). Por outro lado, o meio condicionado das ADSC-EGM (EGM-MC) protegeu as HUVEC^{luc} contra os efeitos deletérios da privação de fatores de crescimento e as induziu a formar uma rede de cordões endoteliais cujo comprimento foi similar ao das células mantidas em EGM-2 (**figura 25A, B**).

Figura 25: O secretoma das ADSC-EGM induz a formação de cordões endoteliais *in vitro*. (A) Formação de cordões endoteliais pelas HUVEC^{luc} cultivadas sobre Matrigel. A formação da rede de cordões ocorre normalmente na presença de EGM-2 e é prejudicada mediante privação de fatores de crescimento (cultivo em MRFC). No entanto, o meio condicionado das ADSC-EGM (EGM-MC) recupera parcialmente o potencial angiogênico das HUVEC^{luc}, o que não ocorre com o meio condicionado das ADSC- α MEM (α MEM-MC). (B) Comprimento dos cordões por campo fotografado. Os dados confirmam o potencial pró-angiogênico do secretoma das ADSC-EGM (n = 6 campos por grupo, *p < 0,05, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.11. O co-transplante de ADSC-EGM aumenta a sobrevida das HUVEC^{luc} *in vivo* e promove a angiogênese

Após observarmos que as ADSC-EGM protegem as HUVEC^{luc} da morte celular e induzem a angiogênese *in vitro*, avaliamos se estes mesmos efeitos poderiam ser observados *in vivo*. Para tanto, 5×10^5 HUVEC^{luc} sozinhas ou combinadas com 5×10^5 ADSC- α MEM ou ADSC-EGM foram misturadas em hidrogéis de colágeno tipo I e transplantadas subcutaneamente em camundongos NSG. A sobrevida das HUVEC^{luc} foi monitorada durante 60 dias por PIBB *in vivo* e, ao final deste período, os organóides gerados foram analisados quanto à formação de vasos sanguíneos.

Após 8 dias do transplante, a maioria das HUVEC^{luc} implantadas sozinhas haviam morrido, restando apenas $3,7\% \pm 0,1\%$ de células vivas, conforme estimado pela normalização da bioluminescência em relação ao dia D+1 (dia 1 após o transplante). No

mesmo período, o co-transplante de ADSC- α MEM aumentou a sobrevida das HUVEC^{luc} para $18,3\% \pm 0,1\%$. As ADSC-EGM foram ainda mais protetivas, pois aumentaram a sobrevida das HUVEC^{luc} para $47,3\% \pm 13,7\%$ (**figura 26A, B**). Ao longo do monitoramento, houve variações no sinal bioluminescente e, após 60 dias, o número de HUVEC^{luc} vivas foi equivalente entre aquelas transplantadas sozinhas e as co-transplantadas com ADSC- α MEM (HUVEC^{luc} = $15\% \pm 0,7\%$; ADSC- α MEM + HUVEC^{luc} = $13\% \pm 0,5\%$, $p = 0,96$). A sobrevida das HUVEC^{luc} co-transplantadas com ADSC-EGM foi aproximadamente 7 vezes maior do que a das células transplantadas nas demais condições ($p = 0,002$). Surpreendentemente, na presença de ADSC-EGM, a sobrevida das HUVEC^{luc} atingiu $105\% \pm 3,5\%$ após 60 dias do transplante, ou seja, o número de células vivas ao final do monitoramento equiparou-se à quantidade de células viáveis detectadas após 1 dia do transplante (**figura 26A, B**). Para uma avaliação global da cinética de sobrevida das HUVEC^{luc}, as áreas sob as curvas de bioluminescência foram comparadas entre os grupos. Esta análise confirmou que as ADSC- α MEM não exerceram efeito na sobrevida das HUVEC^{luc} a longo prazo ($p = 0,97$), ao passo que as ADSC-EGM aumentaram a sobrevida destas células após transplante ($p < 0,04$) (**figura 26C**).

Figura 26: ADSC-EGM aumentam a sobrevida das HUVEC^{luc} após transplante. **(A)** Imagens de três animais representativos de cada grupo obtidas após PIBB *in vivo* durante 60 dias após transplante. **(B)** Quantificação da bioluminescência emitida pelas HUVEC^{luc} durante os 60 dias após o transplante. Nos animais co-transplantados com ADSC-EGM, a quantidade estimada de HUVEC^{luc} vivas após 60 dias foi equivalente à quantidade estimada após 1 dia do transplante. **(C)** Quantificação das áreas sob as curvas da cinética de bioluminescência demonstrando que o co-transplante de ADSC-EGM aumentou a sobrevida das HUVEC^{luc} ($n = 4$ animais, $*p < 0,05$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Após 60 dias do transplante, os organoides foram removidos e inspecionados. Os organoides gerados pela co-infusão de ADSC-EGM e HUVEC^{luc} foram os que apresentaram uma coloração avermelhada mais intensa, sugerindo maior perfusão sanguínea (**figura 27A**, painéis superiores). De fato, análises histológicas dos organoides demonstraram a presença de vasos sanguíneos contendo eritrócitos em seus lúmens, indicando que os mesmos eram perfundidos por sangue e estavam conectados ao sistema circulatório dos animais (**figura 27A**, painéis centrais).

Para quantificar a extensão da área vascular formada pelas HUVEC^{luc}, as secções histológicas foram marcadas com anticorpo anti-CD31 humano (hCD31) e analisadas por imunofluorescência. Em concordância com os dados do PIBB *in vivo*, os organoides gerados pelo co-transplante de ADSC-EGM e HUVEC^{luc} possuíam uma área vascular hCD31⁺ 4,9 vezes e 4,4 vezes maior do que a dos organoides gerados pelo transplante de HUVEC^{luc} sozinhas ou em combinação com ADSC-αMEM, respectivamente ($p < 0,008$) (**figura 27A**, painéis inferiores; **figura 27B**). A área vascular hCD31⁺ foi equivalente nos organoides gerados após o transplante de HUVEC^{luc} sozinhas ou de ADSC-αMEM + HUVEC^{luc} ($p = 0,99$) (**figura 27A**, painéis inferiores; **figura 27B**).

Estes dados demonstram que as ADSC-EGM aumentam a sobrevivência das HUVEC^{luc} *in vivo* e estimulam a angiogênese após transplante.

Figura 27: ADSC-EGM estimulam a angiogênese *in vivo*. (A) Os três painéis superiores demonstram o aspecto macroscópico dos organoides recuperados após 60 dias do transplante. Os organoides gerados pelo co-transplante de ADSC-EGM e HUVEC^{luc} apresentaram uma coloração avermelhada mais intensa, sugerindo maior perfusão sanguínea. As análises histológicas confirmaram a presença de vasos sanguíneos perfundidos nos organoides (painéis intermediários, setas). Análises de imunofluorescência demonstraram a presença de células endoteliais humanas (hCD31⁺) nos cortes histológicos (painéis inferiores). (B) Quantificação da área positiva para hCD31 demonstrando que o co-transplante de ADSC-EGM aumenta a área vascularizada dos organoides ($n = 8$ imagens de 4 secções por grupo, * $p < 0,007$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.12. Geração de uma linhagem de camundongos hemofílicos A imunodeficientes

Para explorar o uso dos organoides vascularizados na correção da hemofilia A, seria preciso dispor de animais hemofílicos A que não rejeitassem as células humanas transplantadas. Para atender a esta necessidade, geramos uma linhagem de camundongos hemofílicos A portadores da imunodeficiência severa combinada (SCID), que leva à depleção de linfócitos T e B.

Para o estabelecimento deste modelo, camundongos imunodeficientes da linhagem NSG portadores de uma mutação no gene *Prkdc* foram cruzados com fêmeas hemofílicas A, as quais possuíam uma mutação no gene *F8*.

Após o primeiro cruzamento, os filhotes resultantes (geração F1) foram caracterizados genotipicamente quanto à presença dos alelos de *F8* selvagens e mutantes. Conforme esperado, os animais machos da geração F1 apresentaram apenas o alelo *F8* mutante, que gera um fragmento de 420 pb após a PCR (**figura 28A**, raia 3), visto que herdaram o único alelo do cromossomo X da mãe hemofílica. Já as fêmeas da geração F1 eram heterozigotas, e, portanto, além do alelo mutante também possuíam o alelo selvagem que gerava um produto de PCR de 620 pb (**figura 28A**, raia 4).

Em seguida, os animais da geração F1 foram cruzados entre si para a obtenção da geração F2. Inicialmente, os animais F2 foram caracterizados genotipicamente e apenas os homozigotos/hemizigotos para o alelo *F8* mutante seriam avaliados quanto à mutação no gene *Prkdc*, que causa a SCID. As raias 5 e 6 do gel (**figura 28A**) exemplificam um casal de animais da geração F2 que eram homozigotos para o alelo *F8* mutante.

Em seguida, as amostras de DNA de todos os animais *F8*^{-/-} da geração F2 foram submetidas a uma reação de PCR para amplificar um fragmento do gene *Prkdc*. Os produtos das PCR foram digeridos com a enzima de restrição AluI, resultando em fragmentos de 68 e 11 pb para o alelo selvagem e 38, 28 e 11 pb para o alelo mutante. Animais heterozigotos deveriam apresentar os fragmentos de 68, 38, 28 e 11 pb. O limite de detecção dos géis de agarose não nos permitiu visualizar os fragmentos de 11 pb, portanto os animais foram selecionados com base nos demais fragmentos.

Conforme esperado, os animais *Prkdc*^{+/-} apresentaram os fragmentos de 68 pb, 38 pb, 28 pb (**figura 28B**, raia 2), ao passo que os animais *Prkdc*^{-/-} não apresentaram o fragmento de 68 pb (**figura 28B**, raia 3). Dentre estes fragmentos, apenas o de 68 pb foi observado nas amostras de animais portadores apenas do alelo selvagem (**figura 28B**, raia 1). Dentre os animais da geração F2 exemplificados na **figura 28B**, apenas os indivíduos 3 e 4 (raias 6 e 7) eram portadores dos alelos *Prkdc* mutantes.

Ao todo, 79 animais da geração F2 foram caracterizados quanto à mutação no gene *F8*, sendo que 33 deles eram homozigotos/hemizigotos para o alelo mutante. Deste

total, 8 camundongos eram homozigotos para o alelo *Prkdc* mutante. Estes animais foram utilizados para gerar a colônia de camundongos SCID/F8 (**figura 28C**).

Figura 28: Genotipagens realizadas durante o estabelecimento da linhagem de camundongos SCID/F8. (A) Caracterização dos alelos do gene *F8* por PCR. O alelo selvagem origina um produto de PCR de 620 pb e o alelo mutante de 420 pb. Os animais imunodeficientes NSG possuíam apenas o alelo selvagem e os hemofílicos A (F8) apenas o alelo mutante, conforme esperado. Ao passo que as fêmeas da geração F1 eram heterozigotas (raia 4) os machos eram homozigotos (raia 3), pois herdaram o cromossomo X da mãe hemofílica. Os dois animais da geração F2 representados (raias 5 e 6) são homozigotos para o alelo mutante. **(B)** Caracterização dos alelos do gene *Prkdc* nos animais da geração F2 por PCR seguida de digestão com a enzima de restrição *AluI*. Os animais selvagens geravam fragmentos de 68 pb e 11pb, os heterozigotos geravam fragmentos de 68 pb, 38 pb, 28 pb e 11 pb e os animais homozigotos para o alelo mutante geravam os fragmentos de 38 pb, 28 pb e 11 pb. A baixa resolução do gel de agarose não permitiu a visualização dos fragmentos de 11 pb. Dentre os animais da geração F2 representados, apenas os indivíduos 3 e 4 (raias 6 e 7) eram homozigotos para o alelo *Prkdc* mutante. **(C)** Frequência dos genótipos encontrados. Dos 79 animais da geração F2, 33 deles eram homozigotos para o alelo *F8* mutante. Destes 33, 8 animais também eram homozigotos para o alelo *Prkdc* mutante. Estes 8 animais foram usados para iniciar a colônia de camundongos SCID/F8.

Após o estabelecimento da colônia, os camundongos SCID/F8 foram caracterizados quanto à atividade biológica do FVIII no plasma por ensaio cromogênico e quanto ao número de linfócitos T e B no baço por citometria de fluxo. Tais análises foram realizadas para confirmar se os animais gerados eram de fato hemofílicos e imunodeficientes, respectivamente.

A atividade pró-coagulante dependente do FVIII (FVIII:C) nas amostras foi determinada em relação à uma curva padrão construída com um *pool* de plasma de camundongos não hemofílicos da linhagem C57BL/6J. A atividade biológica do FVIII no plasma destes animais foi considerada 100%.

Nenhum dos animais SCID/F8 testados apresentou atividade pró-coagulante no plasma ($n = 4$), confirmando o fenótipo de hemofilia A grave nestes animais (**figura 29A**).

Como controles do teste, camundongos das linhagens NSG e F8, usados na geração da linhagem SCID/F8, também foram avaliados quanto à atividade biológica do FVIII. Os animais da linhagem NSG apresentaram uma atividade pró-coagulante de $97,2\% \pm 9,6\%$ ($n = 4$) e, portanto, não eram hemofílicos. Conforme esperado, os animais da linhagem F8 não apresentaram atividade pró-coagulante dependente de FVIII no plasma ($n = 4$) (**figura 29A**).

Em seguida, o número de linfócitos B ($B220/CD45R^+$), linfócitos T CD4 ($CD3^+CD4^+$) e de linfócitos T CD8 ($CD3^+CD8^+$) no baço dos camundongos SCID/F8 foi avaliado por citometria de fluxo.

Os baços dos animais SCID/F8 possuíam quantidades irrisórias das populações de linfócitos analisadas, sendo que as frequências destas células foram similares àsquelas dos camundongos imunodeficientes da linhagem NSG ($p > 0,06$) (**figura 29B**). Portanto, estes dados atestam que os animais F8 eram imunodeficientes. Por outro lado, os camundongos da linhagem F8 apresentaram maior quantidade de todas as populações de linfócitos no baço ($p < 0,0001$), um resultado esperado já que estes animais são imunocompetentes (**figura 29B**).

Figura 29: Caracterização fenotípica dos camundongos SCID/F8. (A) Quantificação da atividade biológica do FVIII (FVIII:C) por ensaio cromogênico. A ausência de atividade biológica do FVIII nos animais SCID/F8 demonstra que os mesmos eram hemofílicos A ($n = 4$ animais, $*p < 0,0001$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey). (B) Quantificação de linfócitos B ($B220/CD45R^+$), T CD4 ($CD3^+CD4^+$) e T CD8 ($CD3^+CD8^+$) no baço dos animais por citometria de fluxo. Os animais SCID/F8 apresentaram depleção de todas as populações de linfócitos analisadas, confirmando o fenótipo de imunodeficiência severa combinada (SCID) ($n = 8$ SCID/F8 e 4 animais para os demais grupos, $*p < 0,0001$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.13. Geração de ADSCs e HUVECs expressando o FVIII humano da coagulação

Com o objetivo de gerar um organoide vascularizado como veículo produtor do FVIII, ADSCs e HUVECs foram transduzidas com um vetor lentiviral bicistrônico que codifica o FVIII humano com o domínio B parcialmente deletado e a proteína repórter fluorescente GFP. Neste vetor, a expressão de ambas as proteínas é comandada pelo promotor do citomegalovírus humano (CMV).

Após 48 h da transdução lentiviral utilizando uma multiplicidade de infecção igual a 1 ($MOI = 1$), tanto as $ADSC^{FVIII-GFP}$ quanto as $HUVEC^{FVIII-GFP}$ já expressavam GFP, conforme verificado após análise por microscopia de fluorescência (**figura 30A**), demonstrando que o vetor era funcional quanto à expressão desta proteína repórter.

Após mais uma semana de cultivo, a frequência de células GFP^+ foi avaliada por citometria de fluxo. As $ADSC-\alpha MEM^{FVIII-GFP}$ foram as que apresentaram a menor frequência de células GFP^+ (51,8%), seguidas pelas $ADSC-EGM^{FVIII-GFP}$ com 63,2% e, pelas $HUVEC^{FVIII-GFP}$ com 88,2% (**figura 30B, C**). Utilizando os dados da citometria de fluxo, quantificamos a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) apenas nas células GFP^+ de cada linhagem. As células GFP^+ da população $ADSC-\alpha MEM^{FVIII-GFP}$ apresentaram a menor MIF (25,5 unidades arbitrárias ou UA), seguidas pelas células $ADSC-EGM^{FVIII-GFP}$ (58,1 UA) e pelas $HUVEC^{FVIII-GFP}$ (109,0 UA), respectivamente (**figura 30C**, barras cinzas).

Figura 30: Análise da fluorescência de ADSCs e HUVECs modificadas para expressar FVIII e GFP. (A) Fotomicrografias de contraste de fase (painéis superiores) e de fluorescência (painéis inferiores) demonstrando a expressão de GFP em ADSCs e HUVECs 48 h após a transdução lentiviral. Aumento = 100X. **(B)** Quantificação de células GFP^+ por citometria de fluxo após 7 dias da transdução lentiviral. **(C)** Representação gráfica da frequência de células GFP^+ (barras pretas) e da mediana da intensidade de fluorescência das células GFP^+ (barras cinzas) presentes em cada população.

Para as etapas subsequentes, as ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} foram submetidas à seleção celular ativada por fluorescência (FACS) para o enriquecimento de células GFP⁺. As ADSC-EGM foram priorizadas em detrimento das ADSC- α MEM devido a sua maior capacidade de promover a sobrevivência das HUVECs e a angiogênese *in vivo*.

Após 24 h da FACS, as ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e as HUVEC^{FVIII-GFP} mantiveram suas morfologias fusiforme e poligonal em cultura, respectivamente, bem como a expressão de GFP (**figura 31A**). Análises por citometria de fluxo após 2 passagens em cultura demonstraram que o sorting celular aumentou o número de células GFP⁺ na população ADSC-EGM^{FVIII-GFP} para 97% e na população HUVEC^{FVIII-GFP} para 93% (**figura 31B**). Embora a frequência de células GFP⁺ em ambas as populações tenha sido semelhante, a atividade biológica do FVIII presente no sobrenadante das culturas de HUVEC^{FVIII-GFP} foi 4,4 vezes maior do que a das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} (**figura 31C**). No entanto, a suplementação do meio EGM-2 com 10% de SFB elevou a atividade biológica do FVIII no sobrenadante das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} de 0,07 para 0,25 UI de FVIII/10⁵ células/48h.

Figura 31: Caracterização das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} após sorting celular. (A) Fotomicrografias de contraste de fase e de fluorescência demonstrando a morfologia das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} 24 h após o sorting celular. **(B)** Frequência de células GFP⁺ em ambas as populações celulares. **(C)** Atividade biológica do FVIII (FVIII:C) no sobrenadante das culturas de ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} estimada por ensaio cromogênico.

4.14. O co-transplante subcutâneo de ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} é ineficaz para corrigir o fenótipo da hemofilia A em camundongos SCID/F8

Após a modificação gênica e o enriquecimento das células GFP⁺, as ADSC^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} foram co-transplantadas subcutaneamente em camundongos SCID/F8 para a geração de organóides produtores de FVIII.

Na primeira tentativa de transplante, cada implante de células foi preparado misturando-se 2x10⁶ ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e 2x10⁶ HUVEC^{FVIII-GFP} em géis de colágeno tipo I e transplantados subcutaneamente no dorso de camundongos SCID/F8 (n = 2 animais).

Cada animal recebeu duas injeções. Animais não transplantados ($n = 2$) foram usados como controles.

Após 15 e 30 dias do transplante, o plasma dos animais transplantados não apresentou atividade biológica de FVIII, conforme avaliado por ensaio cromogênico (**tabela 7**, transplante 1)

Para a segunda tentativa de transplante, visamos aumentar a capacidade protetiva da matriz de colágeno. Para isso, as matrizes de colágeno tipo I foram suplementadas com fibronectina humana, FGF-2 ou com ambos os compostos simultaneamente. Sabe-se que a fibronectina suprime a apoptose de HUVECs após privação de fatores de crescimento *in vitro*⁸⁹ e o FGF-2 também possui propriedades anti-apoptóticas e angiogênicas.⁹⁰

Para a avaliação do efeito protetor das matrizes, HUVEC^{luc} foram embebidas em hidrogéis com as diferentes composições e cultivadas em MRFC durante 48 h. Após este período, as amostras foram submetidas ao PIBB para estimar a quantidade de HUVEC^{luc} vivas. HUVEC^{luc} embebidas apenas em colágeno tipo I e cultivadas em EGM-2 foram usadas como controle positivo do experimento.

A quantificação da bioluminescência demonstrou que a maioria das HUVEC^{luc} embebidas apenas em colágeno morreu perante a privação de fatores de crescimento em relação às células mantidas em EGM-2 (**figura 32**). A suplementação da matriz de colágeno com fibronectina teve um efeito marginal na sobrevivência das HUVEC^{luc} ($p = 0,08$). Por outro lado, as matrizes suplementadas com FGF-2 aumentaram a sobrevivência das HUVEC^{luc} em mais de 9 vezes em relação às células mantidas apenas em colágeno ($p < 0,0001$) (**figura 32**).

Figura 32: Suplementação das matrizes de colágeno com FGF-2 aumenta a sobrevivência das HUVEC^{luc} após privação de fatores de crescimento. (A) Bioluminescência das HUVEC^{luc} cultivadas por 48 h em géis de colágeno com diferentes suplementos. MRFC = meio reduzido de fatores de crescimento. **(B)** Quantificação da bioluminescência. A privação de fatores de crescimento causou a morte da maioria das HUVEC^{luc} embebidas apenas em colágeno em relação às células mantidas em EGM-2. A suplementação dos géis de colágeno com FGF-2 aumentou a sobrevivência das HUVEC^{luc} ($n = 3$, one-way ANOVA + teste de comparações múltiplas de Tukey).

Devido ao seu maior potencial protetivo, utilizamos a matriz de colágeno suplementada com fibronectina e FGF-2 para o segundo transplante. Assim, cada implante foi preparado misturando-se 2×10^6 ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e 2×10^6 HUVEC^{FVIII-GFP} à matriz de colágeno suplementada com fibronectina e FGF-2. Em seguida, cada animal SCID/F8 recebeu 4 injeções subcutâneas em locais diferentes do dorso.

Apesar das modificações na matriz de colágeno e do aumento no número de injeções, os animais transplantados não apresentaram elevação da atividade biológica do FVIII após 15 ou 30 dias da injeção de células (**tabela 7**, transplante 2).

Tabela 7: Dados dos transplantes de ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} em camundongos SCID/F8. Ambas as estratégias de transplante não foram suficientes para corrigir o fenótipo da hemofilia A, visto que não foi detectada atividade biológica do FVIII (FVIII:C) no plasma dos animais transplantados após 15 e 30 dias da inoculação das células. Abreviaturas: Cont = controle; Transp = transplantado.

					FVIII:C (UI/mL)	
	Matriz	Células/injeção	Nº de injeções	Animais	15 dias	30 dias
Transplante 1	Colágeno I	2×10^6 ADSC-EGM ^{FVIII-GFP} + 2×10^6 HUVEC ^{FVIII-GFP}	2	Cont 1	0	0
				Cont 2	0	0
				Transp 1	0	0
				Transp 2	0	0
Transplante 2	Colágeno I + Fibronectina + FGF-2	2×10^6 ADSC-EGM ^{FVIII-GFP} + 2×10^6 HUVEC ^{FVIII-GFP}	4	Cont 1	0	0
				Cont 2	0	0
				Transp 1	0	0
				Transp 2	0	0

4.15. A região onde as células produtoras de FVIII são transplantadas influencia a correção do fenótipo da hemofilia A.

Uma das causas para a ineficácia do transplante das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} na correção da hemofilia A poderia ser a região onde estas células foram implantadas. Sabe-se que a infusão subcutânea de FVIII em camundongos não eleva a atividade pró-coagulante do plasma, ao passo que a referida molécula atinge a circulação sanguínea após injeção intraperitoneal, por exemplo.⁹¹ Assim, avaliamos se a região onde as células produtoras de FVIII são transplantadas teria efeito na correção do fenótipo da hemofilia em camundongos SCID/F8.

Para esta avaliação, utilizamos a linhagem celular de adenocarcinoma hepático humano SK-HEP modificada para expressar FVIII e GFP. As SK-HEP^{FVIII-GFP} estavam disponíveis no banco de células de nosso laboratório e haviam sido transduzidas com o mesmo vetor lentiviral utilizado na modificação gênica das ADSCs e HUVECs. Estas

células foram escolhidas pois seu cultivo é feito em meio convencional DMEM +10% SFB e elas são células imortais que resistiriam a um segundo ciclo de transdução, seleção e expansão, que foi realizado para induzir a expressão de luciferase. Assim, com o objetivo de permitir o rastreamento das células transplantadas, as SK-HEP^{FVIII-GFP} foram transduzidas com um segundo vetor lentiviral que codifica a enzima luciferase 2.

Após seleção com puomicina das células transduzidas, o sobrenadante das SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} foi avaliado quanto à atividade biológica do FVIII. Mesmo após a modificação gênica para a expressão de luciferase, as SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} mantiveram uma secreção de 0,34 UI de FVIII/10⁵ células/48 h *in vitro*, conforme determinado por ensaio cromogênico. Este valor foi semelhante ao observado anteriormente para as HUVEC^{FVIII-GFP} (0,31 UI/10⁵ células/48 h) e para as ADSC-EGM^{FVIII-GFP} cultivadas em meio contendo 10% SFB (0,25 UI/10⁵ células/48 h).

Além disso, a morfologia poligonal típica das SK-HEP e a expressão de GFP foram mantidas (**figura 33A**), pois 96% das células eram GFP⁺, conforme avaliado por citometria de fluxo (**figura 33B**). Além da expressão FVIII e GFP, as SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} também expressavam luciferase biologicamente ativa ($2,4 \times 10^3 \pm 0,18 \times 10^3$ fótons/s/célula), e a intensidade da bioluminescência era diretamente proporcional ao número de células (**figura 33C**).

Figura 33: Caracterização das células SK-HEP^{FVIII-GFP-luc}. (A) Fotomicrografias demonstrando a morfologia (esquerda) e a expressão de GFP (direita) das células SK-HEP^{FVIII-GFP-luc}. (B) Quantificação da frequência de células GFP⁺ na população SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} por citometria de fluxo. A população era composta por 96% de células GFP⁺. (C) Bioluminescência das SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} *in vitro*. As SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} expressavam luciferase biologicamente ativa e a intensidade da bioluminescência era diretamente proporcional ao número de células ($R^2 = 0,99$, teste de regressão linear).

Para os transplantes, 4×10^6 SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} foram misturadas em 40 μ L de matriz de colágeno tipo I suplementada com fibronectina e FGF-2. Em seguida, o total de

células foi dividido em duas injeções subcutâneas ou intra-hepáticas em camundongos SCID/F8.

Após 8 ou 15 dias do transplante, nenhum dos animais que recebeu injeções subcutâneas ($n = 5$ animais) apresentou aumento na atividade biológica do FVIII (**tabela 8**). Por outro lado, dois dos animais que receberam injeções intra-hepáticas já apresentavam 0,54 e 0,99 UI de FVIII/mL após 8 dias do transplante. Após 15 dias, a atividade biológica de FVIII no plasma desses animais aumentou para 0,95 e 2,40 UI/mL, respectivamente (**tabela 8**).

Tabela 8: Atividade biológica do FVIII após transplante subcutâneo e intra-hepático de células SK-HEP^{FVIII-GFP}. Apenas os animais que receberam injeções intra-hepáticas apresentaram atividade biológica de FVIII no plasma.

Local do transplante	Identificação	FVIII:C (UI/mL)	
		8 dias	15 dias
Subcutâneo	Animal 1	0	0
	Animal 2	0	0
	Animal 3	0	0
	Animal 4	0	0
	Animal 5	0	0
Intra-hepático	Animal 1	0	0
	Animal 2	0,54	0,95
	Animal 3	0,99	2,40

Durante o transplante intra-hepático no animal 1, houve refluxo do material injetado e consequente perda de células, o que poderia justificar a falta de atividade biológica de FVIII no plasma (para maiores detalhes das injeções, ver seção 3.34 de material e métodos). De fato, a análise por PIBB após 8 dias do transplante demonstrou que o sinal bioluminescente na região do fígado deste animal correspondia à menos de 5% do sinal detectado nos animais 2 e 3, os quais também apresentaram aumento na atividade biológica de FVIII no plasma (**figura 34A, B**).

Por fim, quantificamos o sinal bioluminescente para avaliar se havia proliferação ou morte celular diferencial ao compararmos os transplantes subcutâneo e intra-hepático. Ao compararmos os dias 8 e 21 após o transplante, houve um aumento na bioluminescência de $3,8 \pm 0,9$ vezes nos animais transplantados subcutaneamente e de $2,7 \pm 2,0$ vezes nos animais que receberam a injeção intra-hepática (**figura 34C, D**). Portanto, o aumento da bioluminescência foi equivalente entre os dois grupos ($p = 0,44$) (**figura 34D**), demonstrando que não há um estímulo diferencial da morte celular ou proliferação celular quando comparamos os microambientes subcutâneo e hepático durante o período analisado.

Figura 34: Rastreamento das células SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} *in vivo* por PIBB. (A) Bioluminescência emitida após 8 dias do transplante intra-hepático, confirmando que as células localizavam-se na região do fígado. **(B)** Quantificação do sinal bioluminescente dos animais que receberam o transplante intra-hepático. O refluxo das células transplantadas no fígado do animal 1 implicou em uma intensidade de bioluminescência correspondente a menos de 5% do sinal detectado nos animais 2 e 3. **(C)** Bioluminescência emitida pelos animais que receberam transplante intra-hepático (painéis superiores) e subcutâneo (painéis inferiores) após 8 e 21 dias do transplante. **(D)** Aumento da intensidade de bioluminescência no 21º dia após o transplante em relação ao 8º dia. O aumento na intensidade da bioluminescência foi equivalente entre os dois grupos ($p = 0,44$, teste t de Student).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos que as ADSCs cultivadas em meio contendo fatores de crescimento angiogênicos preservam suas propriedades progenitoras *in vitro*, possuem maior potencial em proteger células endoteliais da morte celular após co-transplante e promovem a formação de organoides ectópicos vascularizados. Além disso, demonstramos que as células constituintes destes organoides podem ser modificadas *ex vivo* para expressar o FVIII da coagulação, mas que o local de implantação de células produtoras de FVIII é crucial para a correção do fenótipo da hemofilia A.

Embora a identidade *in vivo* das ADSCs ainda seja debatida, postula-se que estas células progenitoras estromais ocupem o espaço perivascular do tecido adiposo.⁵⁵ Com o objetivo induzir a formação de um organoide ectópico vascularizado, as ADSCs foram utilizadas juntamente com as HUVECs para recapitular a formação do nicho vascular após transplante e, assim, gerar vasos sanguíneos estáveis e funcionais. No entanto, sabe-se que as propriedades nativas de células progenitoras estromais como as MO-MSCs e ADSCs deterioram-se ao longo do cultivo convencional. Por exemplo, ao longo do cultivo, as MO-MSCs passam por um processo de diferenciação estocástica, pois aumentam a expressão de marcadores de linhagens específicas como *PAX6* (linhagem ectodérmica), *GATA4* (linhagens endodérmica), *nestina* (linhagens neuronais), *STELLA* (linhagem germinativa) ao passo que reprimem a expressão de *OCT4A* e *NANOG*, os quais regulam a rede de sinalização responsável pela manutenção do estado indiferenciado das células-tronco/progenitoras.^{92,93}

As propriedades das células-tronco/progenitoras são reguladas por uma miríade de interações com elementos celulares e acelulares de seu microambiente nativo. O método mais usado para o cultivo das MO-MSCs e ADSCs é mantê-las em superfícies plásticas na presença de meio de cultivo suplementado com 10-15% de SFB e em normóxia. Estas condições não recapitulam elementos-chave do ambiente nativo das ADSCs e, portanto, causam a deterioração de suas propriedades progenitoras, como o potencial de diferenciação.⁵⁸ De fato, observamos que apenas uma fração das ADSCs cultivadas nestas condições é capaz de ativar o programa de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*.

Assim, a primeira etapa deste trabalho consistiu em estabelecer uma condição de cultivo para as ADSCs capaz de evitar a deterioração de suas propriedades nativas, como as capacidades de proliferação, de diferenciação e de promover a formação e estabilização de vasos sanguíneos funcionais durante a interação com células endoteliais.

Uma das estratégias para diminuir a deterioração das propriedades nativas durante a expansão das células-tronco/progenitoras *in vitro* é mimetizar elementos de seu microambiente nativo que induzem a manutenção de suas características

progenitoras.⁹⁴ No caso das ADSCs, isto ocorre durante a expansão vascular que precede a formação do tecido adiposo, durante a qual as ADSCs perivasculares proliferam em um ambiente pró-angiogênico, mantendo seu estado indiferenciado.⁶¹ Nós observamos que o cultivo em meio para crescimento de células endoteliais (EGM-2) contendo, dentre outros componentes, quatro fatores de crescimento angiogênicos (VEGF, FGF-2, EGF e IGF-1), aumenta a eficiência clonogênica, a proliferação e o potencial de diferenciação das ADSCs em comparação às formulações de meio convencionais contendo 10-15% de SFB.

A maior eficiência clonogênica das ADSCs em EGM-2 pode ser explicada pelas propriedades mitogênicas dos fatores de crescimento que compõem o referido meio. O ensaio de formação de clones avalia a capacidade de células individuais de proliferar e formar colônias, mesmo quando plaqueadas em baixa densidade. Puck e Marcus (1956) foram os primeiros a reportar a técnica de ensaio clonogênico e a utilizaram para avaliar a sensibilidade de células HeLa à radiação ionizante.⁹⁵ Em seus experimentos, as células HeLa eram plaqueadas sobre uma camada alimentadora de fibroblastos irradiados, os quais secretavam fatores solúveis e proteínas de matriz extracelular que facilitavam a formação das colônias. A formação de colônias por MO-MSCs, por exemplo, é facilitada após suplementação do meio de cultivo com EGF e PDGF, devido ao efeito mitogênico destas moléculas.⁹⁶ Não há estudos demonstrando o efeito de fatores pró-angiogênicos na eficiência clonogênica das ADSCs. Nossos dados demonstram que os fatores de crescimento presentes no EGM-2 exercem efeito permissivo para a proliferação das células progenitoras presentes no tecido adiposo. Notavelmente, observamos que a frequência de células estromais na FEV do tecido adiposo é de ~60%, mas o cultivo em EGM-2 elevou a eficiência clonogênica para apenas ~4%. Estes dados indicam que o efeito pró-mitogênico é restrito a uma pequena fração das células estromais do tecido adiposo.

Em concordância com o aumento da eficiência clonogênica, o EGM-2 também acelerou a proliferação das ADSCs ao longo do cultivo extensivo. Este efeito mitogênico do EGM-2 também foi observado por Suga *et al.*,⁹⁷ sendo que o tempo médio de duplicação das ADSCs durante as segunda e terceira passagens foi de 23,6 h, similar ao observado neste trabalho (18,3 h).

Embora tenha sido mais rápido, o crescimento das ADSCs cultivadas em EGM-2 atingiu o início da fase estacionária precocemente em relação às células mantidas em α MEM e em DMEM. Suga *et al.* também reportaram este fenômeno ao comparar ADSCs cultivadas em EGM-2 e em DMEM.⁹⁷ Este comportamento reitera achados anteriores demonstrando que as ADSCs têm um potencial finito de replicação celular *in vitro*⁹⁸ e indica que a aceleração do crescimento causada pelo EGM-2 antecipou a senescência replicativa das ADSCs. Um dos mecanismos que poderia limitar o número de duplicações das ADSCs é a ausência da expressão da enzima telomerase, levando ao encurtamento

dos telômeros a cada mitose até atingir um comprimento crítico que ativa as vias de sinalização indutoras da senescência replicativa. Nós confirmamos que as ADSCs, independentemente do meio onde foram cultivadas, não expressam o RNAm codificante da enzima telomerase, o que também foi reportado em trabalhos anteriores.⁹⁹

Após cultivo em α MEM ou DMEM, observamos que apenas parte das ADSCs foi capaz de se diferenciar em adipócitos e osteoblastos *in vitro*. Estes dados corroboram constatações anteriores de que as ADSCs cultivadas em DMEM perdem gradativamente os potenciais de diferenciação adipogênico e osteogênico ao longo do cultivo.⁵⁸ No entanto, nós demonstramos que o cultivo em EGM-2 estimula a preservação do potencial de diferenciação das ADSCs após a expansão *in vitro*. Ao contrário de nossos achados, Suga *et al.* reportaram que o cultivo em EGM-2 não aumentou o potencial de diferenciação das ADSCs em comparação ao cultivo em DMEM.⁹⁷ Esta diferença pode ser devida à indução da diferenciação das ADSCs ter sido ainda na primeira passagem, enquanto nós realizamos a indução na terceira passagem. Assim, a redução do potencial de diferenciação das ADSCs cultivadas em DMEM pode ter sido mínima devido ao curto período de cultivo no trabalho de Suga *et al.* Em concordância com esta hipótese, Schellenberg *et al.* demonstraram que a redução do potencial de diferenciação de clones de ADSCs é perceptível a partir da terceira passagem.⁵⁸

Diversas estratégias alternativas de cultivo para manutenção das propriedades progenitoras de MO-MSCs e ADSCs já foram reportadas. Por exemplo, MO-MSCs e ADSCs murinas cultivadas em hipóxia apresentam maior capacidade de proliferação e diferenciação do que as células cultivadas em normóxia.^{92,100} Estes efeitos são causados presumivelmente pela ativação da via do fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) que leva à supressão de p21.⁹² Como exemplo do uso de fatores de crescimento, MO-MSCs cultivadas com IGF-1 na ausência de SFB apresentam maior potencial proliferativo e de diferenciação osteogênica *in vitro*.¹⁰¹

Os achados do presente trabalho desdobraram-se em uma dissertação de mestrado que avaliou quais os fatores de crescimento que compõem o EGM-2 são os responsáveis pelo efeito do referido meio nas propriedades progenitoras das ADSCs *in vitro*. Apenas o EGF e FGF-2, mas não o VEGF e IGF-1, recapitularam o efeito do EGM-2 sobre a proliferação, o potencial clonogênico e o potencial de diferenciação das ADSCs.¹⁰²

O cultivo também pode alterar a expressão de moléculas de superfície celular. Estudos já demonstraram que as ADSCs são células perivasculares e que expressam a glicoproteína CD34 *in situ*,¹⁰³ característica que é compartilhada com todas as células estromais (CD31⁻CD45⁻) da FEV do tecido adiposo,¹⁰⁴ o que foi corroborado neste trabalho. No entanto, nossos dados e trabalhos anteriores demonstraram que a expressão de CD34 é perdida durante o cultivo das ADSCs.⁷⁵ Curiosamente, este fenômeno não é restrito às ADSCs, visto que HUVECs e células satélites do músculo

estriado esquelético também perdem a expressão do referido marcador quando cultivadas.^{105,106}

Os mecanismos moleculares que levam à perda da expressão de CD34 durante o cultivo são desconhecidos. No entanto, foi demonstrado que o cultivo em alta densidade celular, a retirada de moléculas mitogênicas e a redução de SFB nos meios de cultivo retardam a perda de CD34 em HUVECs e ADSCs.^{105,107} Além disso, foi demonstrado que o número de duplicações celulares *in vitro* é inversamente proporcional à frequência de células CD34⁺ na população de ADSCs cultivadas.¹⁰⁷

Ao contrário das ADSC- α MEM, observamos que as ADSC-EGM recuperaram a expressão de CD34 *in vivo* após transplante. Tentativas de recuperar a expressão de CD34 em HUVECs por meio do cultivo em alta densidade levaram à postulação de que a perda na expressão do referido marcador era irreversível.¹⁰⁵ No caso de ADSCs, não existem relatos sobre a reexpressão deste marcador. Pela primeira vez, nós demonstramos que o cultivo em EGM-2 não impede a hiporregulação de CD34 nas ADSCs *in vitro*, mas as mantém capazes de recuperar a expressão deste marcador *in vivo*. As interações intercelulares e com a matriz extracelular no ambiente tridimensional dos organoides, bem como a ausência das moléculas mitogênicas presentes no meio de cultivo podem ter permitido a recuperação da expressão de CD34 nas ADSC-EGM. A perda irreversível nas ADSC- α MEM pode ter sido decorrente do silenciamento epigenético permanente do gene *CD34* ou de seus genes reguladores, uma vez que o perfil epigenético das ADSCs é alterado ao longo do cultivo.¹⁰⁸ Estudos envolvendo cultivo tridimensional e análises do perfil epigenético das ADSCs cultivadas nos diferentes meios e após transplante são necessários para avaliar estas especulações.

Embora a expressão de CD34 tenha sido observada em populações de células-tronco ou progenitoras de diversos tecidos, sua função na biologia destas células ainda é pouco compreendida.¹⁰⁶ Suga *et al.* analisaram algumas propriedades de ADSCs CD34⁺ e CD34⁻ separadas após cultivo breve (7 dias) das células da FEV.¹⁰⁹ Eles observaram que a população de ADSCs CD34⁺ apresentou maior potencial proliferativo e maior eficiência clonogênica do que as células CD34⁻. Assim, nossos dados indicam que o cultivo em condições convencionais (α MEM) causa a perda irreversível de características nativas das ADSCs, como a expressão de CD34, que pode ser relevante para sua atividade como células progenitoras *in vivo*.

Os organoides gerados pelo transplante de ADSCs, independentemente do meio em que foram cultivadas, não apresentaram sinais de diferenciação adipogênica ou osteogênica. O transplante de células da FEV não cultivadas demonstrou que a matriz de colágeno tipo I impede a adipogênese *in vivo*, o que não ocorre quando o transplante é feito em Matrigel. De fato, Chun *et al.* demonstraram que pré-adipócitos murinos embebidos em uma matriz tridimensional contendo 3,2 mg/mL de colágeno tipo I são

incapazes de acumular grandes vesículas lipídicas.¹¹⁰ Isso porque a adipogênese requer a degradação eficiente das moléculas de colágeno circunjacente por ação da metaloproteinase associada à membrana MT1-MPP, que é expressa pelos pré-adipócitos. Assim, ao reduzir a concentração de colágeno para 2,4 mg/mL, os autores foram capazes de induzir a adipogênese *in vitro*. Nós constatamos que é possível induzir a adipogênese *in vitro* nas ADSCs embebidas em matrizes com 3 mg/mL de colágeno, a mesma concentração utilizada nos transplantes (*dados não mostrados*). No entanto, o estímulo adipogênico *in vivo* é menos potente em relação ao do meio de indução de adipogênese utilizado *in vitro* e, portanto, deve ser insuficiente para superar o obstáculo imposto pela alta concentração de colágeno tipo I na matriz dos organoides. Além de fatores de crescimento que podem ter auxiliado a diferenciação das células da FEV, o Matrigel é composto majoritariamente por laminina, colágeno tipo IV e entactina.^{111,112} Portanto, a ausência de colágeno tipo I dentre os principais componentes desta matriz extracelular pode ter facilitado a diferenciação adipogênica das células da FEV.

Tendo em vista o objetivo otimizar a sobrevivência das células endoteliais transplantadas e a formação de organoides vascularizados, investigamos o efeito do cultivo em EGM-2 nas propriedades angiogênicas das ADSCs.

Quando implantadas subcutaneamente, as HUVECs entram em apoptose antes que sejam capazes de se organizar em uma rede de vasos sanguíneos.⁴² Este fenômeno pode ser explicado pela equivalência entre sinais pró-angiogênicos e anti-angiogênicos que é característica da homeostase.¹¹³ Por outro lado, mediante a uma lesão tecidual, por exemplo, os sinais pró-angiogênicos prevalecem sobre os anti-angiogênicos, ativando o processo de vascularização local que é importante durante a regeneração tecidual.¹¹⁴ Assim, diversos trabalhos já demonstraram que a indução de lesão prévia no sítio/órgão de interesse permite a enxertia das células endoteliais transplantadas nestes locais.^{35,115}

Para mimetizar a falta de sinais pró-angiogênicos enfrentadas pelas HUVECs após o transplante em sítios não lesados, estabelecemos um modelo de cultivo em meio α MEM suplementado com apenas 1% de SFB, que nós denominamos de meio reduzido de fatores de crescimento (MRFC). Nestas condições, as HUVECs ativaram a apoptose em 24 h e progrediram para o estágio de apoptose tardia/necrose após 48 h, caracterizado pela perda da integridade da membrana plasmática. Estes resultados corroboram outros trabalhos que descreveram a ativação da apoptose *in vitro* em células endoteliais privadas de fatores de crescimento.^{116,117} Além disso, nossas observações reiteram a dependência de fatores de crescimento para a sobrevivência das HUVECs *in vitro*, um obstáculo conhecido desde as primeiras tentativas de isolamento desta população celular.¹¹⁸

Utilizando técnicas de co-cultivo e geração de meio condicionado em MRFC, demonstramos que as ADSC-EGM tem efeito protetivo contra a ativação da apoptose nas

HUVECs durante a privação de fatores de crescimento. Este efeito foi observado durante o co-cultivo direto entre ambas as populações, mas também foi recapitulado ao utilizarmos apenas o meio condicionado das ADSC-EGM. Em contrapartida, as ADSC- α MEM não foram capazes de promover a sobrevida das HUVECs em nenhum dos experimentos realizados *in vitro*. Além disso, apenas as ADSC-EGM foram capazes de induzir a formação de cordões endoteliais pelas HUVECs durante o co-cultivo direto ou via secretoma em HUVECs mantidas sobre Matrigel. Não existem trabalhos publicados demonstrando o efeito protetivo e pró-angiogênico das ADSCs pré-cultivadas em EGM-2. Diversos grupos já demonstraram que o co-cultivo de MO-MSCs/ADSCs com células endoteliais facilita a formação de cordões endoteliais e os estabiliza.¹¹⁹⁻¹²² No entanto, em todos os casos analisados os co-cultivos foram feitos em meios contendo alta concentração de SFB ($\geq 10\%$) ou em meios para células endoteliais, como o EGM-2, os quais contêm concentrações elevadas de fatores de crescimento pró-angiogênicos. Portanto, os fatores pró-angiogênicos presentes nestes meios impedem a avaliação do efeito protetivo e pró-angiogênico das MO-MSCs/ADSCs, já que, segundo nossos dados, estas moléculas por si já estimulam a formação dos cordões endoteliais, protegem as células endoteliais da apoptose e condicionam as ADSCs a estimularem a sobrevida das células endoteliais e a angiogênese.

Em concordância com os ensaios de co-cultivo *in vitro*, as ADSC- α MEM não promoveram a sobrevida das HUVEC^{luc} a longo prazo (60 dias) após transplante. Não existem estudos que avaliaram a sobrevida de células endoteliais co-transplantadas com ADSCs utilizando PIBB *in vivo*. No entanto, dois trabalhos utilizaram PIBB para demonstrar que o co-transplante de MO-MSCs cultivadas usando métodos convencionais aumenta a sobrevida de células endoteliais expressando luciferase.^{123,124} Contudo, ambos os trabalhos reportam a quantificação da bioluminescência de apenas um animal, o que é insuficiente para estabelecer conclusões a respeito do efeito protetivo das MO-MSCs. Por exemplo, nós também observamos que alguns animais transplantados apenas com HUVEC^{luc} apresentaram bioluminescência inferior a alguns animais que receberam HUVEC^{luc} e ADSC- α MEM, ainda que as médias da intensidade de bioluminescência tenham sido estatisticamente equivalentes.

Após estabelecermos as condições para o co-transplante de ADSCs e HUVECs, ambas as populações celulares foram modificadas geneticamente para expressar o FVIII da coagulação e a proteína repórter GFP. Em seguida, as ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} foram submetidas à seleção de células GFP⁺ e caracterizadas.

Não encontramos trabalhos demonstrando a atividade biológica de FVIII em ADSCs humanas indiferenciadas. Entretanto, Ogata *et al.* induziram a expressão de FVIII em ADSCs previamente estimuladas a se diferenciar em adipócitos. Os autores detectaram uma produção de 32 ng de FVIII/10⁵ células/48 h.¹²⁵ Considerando que 1 UI

de FVIII corresponde à 200 ng/mL de proteína ativa, a atividade biológica de FVIII seria 0,16 UI/10⁵ células/48 h. No entanto, este cálculo é superestimado uma vez que apenas parte das moléculas de FVIII presentes no sobrenadante é biologicamente ativa. A atividade das ADSC-EGM^{FVIII-GFP} detectada no presente trabalho foi de 0,07 UI/10⁵ células/48 h em EGM-2, que contém apenas 2% de SFB. Ao utilizarmos EGM-2 suplementado com 10% de SFB, que é a mesma concentração usada por Ogata *et al.*, a atividade biológica aumentou para 0,25 UI/10⁵ células/48 h. Utilizando MO-MSCs, que são células com propriedades biológicas similares às das ADSCs, Van Damme *et al.* detectaram uma atividade biológica máxima de 0,07 UI/10⁵ células/24 h em meio contendo 10% de SFB.¹²⁶ Portanto, a produção de FVIII biologicamente ativo pelas ADSC-EGM^{FVIII-GFP} no presente trabalho é semelhante à reportada em trabalhos anteriores utilizando ADSCs e MO-MSCs humanas.

As HUVEC^{FVIII-GFP} produziram 0,31 UI de FVIII/10⁵ células/48 h *in vitro*, um valor 5 vezes superior ao reportado por Rosenberg *et al.*, mas cuja população era composta por apenas ~50% de células transduzidas.¹²⁷ Notavelmente, a atividade biológica de FVIII no sobrenadante das HUVEC^{FVIII-GFP} foi >4 vezes superior ao das ADSC-EGM^{FVIII-GFP}, ainda que a frequência de células GFP⁺ tenha sido semelhante entre as duas populações (93% vs. 97%) e que a mediana da intensidade de fluorescência das células GFP⁺ tenha sido menor nas HUVEC^{FVIII-GFP} (70,9 vs. 97,4). Estes dados indicam que a maior produção de FVIII biologicamente ativo pelas HUVEC^{FVIII-GFP} não é devida à expressão mais intensa das sequências codificantes presentes no vetor lentiviral.

Uma das possíveis explicações para este fenômeno é que as HUVECs, bem como outras células endoteliais, megacariócitos e plaquetas, expressam o fator de von Willebrand (VWF),¹²⁷ uma glicoproteína que, dentre outras funções, liga-se ao FVIII e prolonga sua meia-vida após a secreção.¹²⁸ Por exemplo, o trabalho pioneiro de Kaufman *et al.* demonstrou que a expressão ectópica de VWF em células CHO previamente modificadas para expressar FVIII induzem o acúmulo de FVIII biologicamente ativo no meio de cultura.¹²⁹ Assim, o VWF expresso pelas HUVEC^{FVIII-GFP} poderia ter elevado a estabilidade do FVIII secretado, levando a maior atividade pró-coagulante do meio de cultura.

Apesar de as ADSC-EGM^{FVIII-GFP} e HUVEC^{FVIII-GFP} expressarem FVIII biologicamente ativo em quantidades comparáveis ao reportado na literatura, o co-transplante subcutâneo de ambas as células não corrigiu o fenótipo da hemofilia A. Em concordância com nossos resultados, outros grupos de pesquisa reportaram que o transplante subcutâneo de MO-MSCs, fibroblastos ou mioblastos modificados para expressar FVIII foi incapaz de elevar a atividade pró-coagulante do plasma de animais hemofílicos.^{91,130,131} Por outro lado, esta abordagem foi promissora para o tratamento experimental da hemofilia B, visto que há mais de 20 anos, Palmer *et al.* demonstraram que o fator IX

produzido por fibroblastos implantados subcutaneamente era detectado na circulação dos animais receptores.³⁴ Resultados semelhantes foram obtidos mais recentemente após o transplante de mioblastos, MO-MSCs e fibroblastos modificados para expressar FIX.^{91,132,133}

A absorção de moléculas produzidas ou introduzidas no espaço subcutâneo é limitada por diversas variáveis, sendo o peso molecular uma das mais importantes. Além de terem que escapar do aprisionamento pelas moléculas da matriz extracelular, como o ácido hialurônico e o colágeno, proteínas com mais de 16 kDa não podem ser absorvidas diretamente pelos capilares. Para atingir a circulação, elas devem ser drenadas pelos vasos linfáticos para então chegarem aos vasos sanguíneos.¹³⁴ Enquanto o FIX possui um peso molecular de 52 kDa, as moléculas de FVIII com o domínio B deletado produzidas no presente trabalho são ~3 vezes maiores (170 kDa). Além disso, ao serem produzidas pelas HUVEC^{FVIII-GFP}, cada molécula de FVIII pode se ligar à um concatâmero formado por 50 monômeros de VWF, gerando um complexo com mais de 12.000 kDa. Esta proporção de 1:50 (FVIII:VWF) é a usualmente observada para o FVIII circulante.⁹ Portanto, o tamanho das moléculas de FVIII e/ou dos complexos formados pela interação com o VWF impõem uma grande limitação à difusão em relação às moléculas de FIX, por exemplo. De fato, ao passo que a administração subcutânea de FIX recombinante corrige o fenótipo da hemofilia B em cães,¹³⁵ moléculas de FVIII injetadas subcutaneamente sequer atingem a circulação sistêmica.⁹¹

Foi reportado recentemente que um anticorpo biespecífico (ACE910) que se liga aos FIX e FX e mimetiza a função do FVIII aumenta a atividade pró-coagulante em pacientes hemofílicos após injeção subcutânea.¹³⁶ Uma das vantagens desta nova molécula em relação ao FVIII é sua alta biodisponibilidade após injeção subcutânea. Assim, se a eficácia deste anticorpo for comprovada nos ensaios clínicos subsequentes, células modificadas para secretar tais moléculas poderiam ser exploradas como ferramenta terapêutica profilática para a hemofilia A.

Ao contrário do espaço subcutâneo, o fígado apresenta várias características que poderiam facilitar a difusão do FVIII produzido pelas células transplantadas para a circulação sanguínea. Além de ser um órgão altamente vascularizado, o fígado é composto por capilares sinusóides cujas células endoteliais possuem aberturas de 100-200 nm de diâmetro chamadas fenestras. Estas fenestras não possuem diafragma e tampouco são recobertas por lâmina basal em sua face abluminal. A combinação destas características com a capacidade das células endoteliais sinusoidais em realizar a transcitose (transporte de macromoléculas através das células) tornam a extensa rede de sinusóides hepáticos altamente permeável.¹³⁷

Em concordância com estas propriedades, o transplante de células SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} no espaço subcapsular do fígado resultou em uma atividade biológica de FVIII no

plasma dos animais de pelo menos 0,5 UI/mL após 8 dias, corrigindo o fenótipo da Hemofilia A. Após mais uma semana, a atividade biológica do FVIII chegou a atingir >2 UI/mL, corroborando a concepção de que a sobredose de FVIII é tolerável. Por outro lado, o transplante subcutâneo não foi capaz de elevar a atividade pró-coagulante do plasma. Conforme estimado por PIBB, a proliferação das SK-HEP^{FVIII-GFP-luc} foi equivalente entre os dois locais de transplante. Isto indica que a maior eficiência terapêutica do transplante intra-hepático é devida à difusão facilitada do FVIII produzido localmente, e não à um favorecimento da sobrevida ou da proliferação das células transplantadas.

Estudos anteriores demonstraram que o transplante intra-hepático de células endoteliais sinusoidais hepáticas murinas ou de células endoteliais obtidas a partir da diferenciação de células-tronco de pluripotência induzida (iPS) é capaz de aumentar a atividade biológica de FVIII no plasma de camundongos hemofílicos A.^{35,36} No entanto, a enxertia das células transplantadas no fígado não lesado é extremamente baixa: Follenzi *et al.* relataram que as células transplantadas consistiam em apenas 0,3% da população celular não parenquimática, ou seja, excluindo-se todos os hepatócitos.³⁵ Por esta razão, o transplante realizado nestes trabalhos foi precedido por indução de lesão prévia no fígado induzida por irradiação ionizante³⁶ ou pela administração do composto hepatotóxico monocrotalina.³⁵ Segundo nossos dados, o co-transplante subcutâneo de ADSCs previamente cultivadas em EGM-2 eleva a enxertia das células endoteliais para ~100% após 60 dias. Se estes resultados forem recapitulados no microambiente hepático, não haveria a necessidade de lesão prévia do fígado para garantir o domicílio das células transplantadas. Além disso, observamos que suplementação da matriz de colágeno com FGF-2 eleva a resistência das HUVECs contra a morte celular induzida pela privação de fatores de crescimento. Assim, esta seria uma estratégia complementar para promover a sobrevida das células endoteliais transplantadas.

Em conclusão, o cultivo das ADSCs em EGM-2 auxilia na manutenção de suas características progenitoras *in vitro* e aumenta suas propriedades pró-angiogênicas *in vivo*. Estes resultados abrem caminho para a identificação de moléculas críticas para a regulação das propriedades biológicas das ADSCs e estabelecem uma estratégia de condicionamento para elevar a sobrevida e a enxertia de células endoteliais co-transplantadas. Além disso, os resultados variáveis dos ensaios clínicos utilizando MO-MSCs ou ADSCs para o tratamento de doenças isquêmicas¹³⁸ apontam para a necessidade de identificar estratégias de pré-condicionamento para elevar a eficiência terapêutica destas células após transplante. Esta meta é atualmente considerada uma das fronteiras da terapia celular utilizando células-tronco/progenitoras estromais.⁶⁰ Assim, o aumento das propriedades angiogênicas e citoprotetoras das ADSCs cultivadas em EGM-2 indica que esta é uma estratégia potencialmente capaz de elevar a eficiência terapêutica das ADSCs no tratamento de doenças isquêmicas, sobretudo em combinação

com outras células-tronco/progenitoras capazes de se diferenciar e reconstituir o tecido danificado.

Concluimos ainda que, embora o transplante de células produtoras de FVIII seja capaz de corrigir o fenótipo da hemofilia A, o sítio de implantação destas células é uma variável crítica para o sucesso desta estratégia terapêutica. Assim, é preciso otimizar não somente a sobrevivência das células transplantadas mas também a difusão do FVIII produzido para a circulação, o que pode ser conseguido por meio do transplante em sítios altamente vascularizados, como o fígado.

Conclusões

6. Conclusões

Em comparação com as formulações de meios de cultivo convencionais, o cultivo em EGM-2 aumenta o potencial proliferativo, a eficiência clonogênica e o potencial de diferenciação das ADSCs *in vitro*. Tal estratégia de cultivo também condiciona as ADSCs a proverem maior suporte à sobrevivência de HUVECs e à angiogênese, pois o co-transplante de ADSCs cultivadas em EGM-2 prolonga a sobrevivência das HUVECs, induzem-nas a se organizar em vasos sanguíneos funcionais e, assim, leva à geração de organoides ectópicos vascularizados.

Embora as ADSC-EGM e HUVECs possam ser modificadas *ex vivo* para expressar FVIII biologicamente ativo, o co-transplante subcutâneo destas células não foi capaz de corrigir o fenótipo da hemofilia A. Utilizando células de hepatocarcinoma (SK-HEP) expressando FVIII, demonstramos que, ao contrário do transplante subcutâneo, a infusão das células em sítios altamente vascularizados como o fígado permite que o FVIII produzido atinja a circulação sanguínea sistêmica e corrija o fenótipo da hemofilia A.

Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Favaloro EJ. Inherited disorders of blood coagulation. *Ann Med*. 2012;44(5):405–18.
2. Chuah MK, Nair N, VandenDriessche T. Recent progress in gene therapy for hemophilia. *Hum Gene Ther*. 2012;23(6):557–65.
3. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, et al. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(3):560–560.
4. Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res*. 2007;119(1):1–13.
5. Lenting PJ, Christophe OD, Gueguen P. The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia*. 2010;16(102):6–15.
6. Scharrer I, Encke A, Hottenrott C. Clinical cure of haemophilia A by liver transplantation. *Lancet*. 1988;2(8614):800–1.
7. Everett LA, Cleuren ACA, Khoriaty RN, Ginsburg D. Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells. *Blood*. 2014;123(24):3697–705.
8. Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, Lavend'homme R, Rega F, Saint-Remy JM, et al. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood*. 2006;108(2):515–7.
9. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins P V. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*. 2010;16:3–13.
10. Fischer K, Collins P, Björkman S, Blanchette V, Oh M, Fritsch S, et al. Trends in bleeding patterns during prophylaxis for severe haemophilia: Observations from a series of prospective clinical trials. *Haemophilia*. 2011;17(3):433–8.
11. Ikkala E, Helske T, Myllyla G, Nevanlinna HR, Pitkanen P, Rasi V. Changes in the life expectancy of patients with severe haemophilia A in Finland in 1930–79. *Br J Haematol*. 1982;52(1):7–12.
12. Triemstra M, Rosendaal FR, Smit C, Van der Ploeg HM, Briet E. Mortality in patients with hemophilia. Changes in a Dutch population from 1986 to 1992 and 1973 to 1986. *Ann Intern Med*. 1995;123(11):823–7.
13. Pool JG, Shannon AE. Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. *New Eng J Med*. 1965;273(27).
14. Webster WP, Roberts HR, Thelin GM, Wagner RH, Brinkhous KM. Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. *Am J Med Sci*. 1965;250(6):643–51.
15. Soucie JM, Nuss R, Evatt B, Abdelhak A, Cowan L, Hill H, et al. Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. The hemophilia surveillance system project investigators. *Blood*. 2000;96(2):437–42.
16. Plug I, Van Der Bom JG, Peters M, Mauser-Bunschoten EP, De Goede-Bolder A, Heijnen L, et al. Mortality and causes of death in patients with hemophilia, 1992–2001: a prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):510–6.
17. Goedert JJ, Chen BE, Preiss L, Aledort LM, Rosenberg PS. Reconstruction of the hepatitis C virus epidemic in the US hemophilia population, 1940–1990. *Am J Epidemiol*. 2007;165(12):1443–53.
18. Powell JS. Recombinant factor VIII in the management of hemophilia A: current

- use and future promise. *Ther Clin Risk Manag*. 2009;5(2):391–402.
19. Swiech K, Kamen A, Ansorge S, Durocher Y, Picanco-Castro V, Russo-Carbolante EM, et al. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. *BMC Biotechnol*. 2011;11:114.
 20. Picanco-Castro V, Russo-Carbolante EM, Fontes AM, Fernandes AC, Covas DT. An enhancer/promoter combination strengthens the expression of blood-coagulation factor VIII in non-viral expression vectors. *Genet Mol Res*. 2008;7(2):314–25.
 21. Picanco V, Heinz S, Bott D, Behrmann M, Covas DT, Seifried E, et al. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. *Cytotherapy*. 2007;9(8):785–94.
 22. Berntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *Lancet*. 2012;379(9824):1447–56.
 23. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med*. 2007;357(6):535–44.
 24. Valentino LA, Ewenstein B, Navickis RJ, Wilkes MM. Central venous access devices in haemophilia. *Haemophilia*. 2004;10(2):134–46.
 25. Mancuso ME, Berardinelli L, Beretta C, Raiteri M, Pozzoli E, Santagostino E. Improved treatment feasibility in children with hemophilia using arteriovenous fistulae: The results after seven years of follow-up. *Haematologica*. 2009;94(5):687–92.
 26. Swystun LL, Lillicrap D. Gene Therapy for Coagulation Disorders. *Circ Res*. 2016;118(9):1443–52.
 27. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011;365(25):2357–65.
 28. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371(21):1994–2004.
 29. High KA. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Blood*. 2012;120(23):4482–7.
 30. Rawle FEM, Shi CX, Brown B, McKinven A, Tinlin S, Graham FL, et al. Heterogeneity of the immune response to adenovirus-mediated factor VIII gene therapy in different inbred hemophilic mouse strains. *J Gene Med*. 2004;6(12):1358–68.
 31. McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, Lee D, Rabbani S, Raj D, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*. 2013;121(17):3335–44.
 32. Boyce N. Trial halted after gene shows up in semen. *Nature*. 2001;414(6865):677.
 33. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*. 2009;199(3):381–90.
 34. Palmer TD, Thompson AR, Miller AD. Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts: potential therapy for hemophilia B. *Blood*. 1989;73(2):438–45.
 35. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest*. 2008;118(3):935–45.

36. Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(3):808–13.
37. Shi Q, Kuether EL, Chen Y, Schroeder JA, Fahs SA, Montgomery RR. Platelet gene therapy corrects the hemophilic phenotype in immunocompromised hemophilia A mice transplanted with genetically manipulated human cord blood stem cells. *Blood*. 2014;123(3):395–403.
38. Roth DA, Tawa Jr. NE, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1735–42.
39. Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):362–9.
40. Weiss P, Taylor AC. Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1960;46(9):1177–85.
41. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol*. 2016;18(3):246–54.
42. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*. 2008;111(9):4551–8.
43. Enis DR, Shepherd BR, Wang Y, Qasim A, Shanahan CM, Weissberg PL, et al. Induction, differentiation, and remodeling of blood vessels after transplantation of Bcl-2-transduced endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(2):425–30.
44. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3:393–403.
45. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik N V., Panasyuk, Andrey F.; Keiliss-Borok I V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17:331–40.
46. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987;20:263–72.
47. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42–60.
48. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641–50.
49. 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*. 2006;8:315–7.
50. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 2007;131:324–36.
51. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
52. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–95.

53. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, 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. 2013;15(6):641–8.
54. Brocher J, Janicki P, Voltz P, Seebach E, Neumann E, Mueller-Ladner U, et al. Inferior ectopic bone formation of mesenchymal stromal cells from adipose tissue compared to bone marrow: Rescue by chondrogenic pre-induction. *Stem Cell Res.* 2013;11(3):1393–406.
55. Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science.* 2008;322:583–6.
56. Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med.* 2011;9(1):10.
57. Oñate B, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, Ybarra J, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, et al. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* 2012;26(10):4327–36.
58. Schellenberg A, Stiehl T, Horn P, Jousen S, Pallua N, Ho AD, et al. Population dynamics of mesenchymal stromal cells during culture expansion. *Cytotherapy.* 2012;14(4):401–11.
59. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):11–22.
60. Karantalis V, Hare JM. Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease. *Circ Res.* 2015;116(8):1413–30.
61. Han J, Lee J-E, Jin J, Lim JS, Oh N, Kim K, et al. The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development.* 2011;138(22):5027–37.
62. Bi L, Lawler a M, Antonarakis SE, High K a, Gearhart JD, Kazazian HH. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet.* 1995;10(1):119–21.
63. Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood.* 1996;88(9):3446–50.
64. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329(1):77–84.
65. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavaría MD, et al. Genomic Analysis of a Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis to Bone Reveals a Role for the Extracellular Matrix. *Mol Cancer Res.* 2005;3(1):1–13.
66. Kuroda H, Kutner RH, Bazan NG, Reiser J. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods.* 2009;157(2):113–21.
67. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. *Stem Cells.* 2007;25(10):2660–9.
68. Kutner RH, Zhang X-Y, Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc.* 2009;4(4):495–505.
69. Segura MM, Garnier A, Durocher Y, Ansorge S, Kamen A. New protocol for lentiviral vector mass production. In: *Methods in Molecular Biology.* 2010. p. 39–

- 52.
70. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101–9.
71. da Silva Meirelles L, Maistro Malta T, de Deus Wagatsuma VM, Palma PVB, Araujo AG, Ribeiro Malmegrim KC, et al. Cultured human adipose tissue pericytes and mesenchymal stromal cells display a very similar gene expression profile. *Stem Cells Dev*. 2015;55(51):2822–40.
72. Hutton DL, Grayson WL. Hypoxia inhibits de novo vascular assembly of adipose-derived stromal/stem cell populations, but promotes growth of preformed vessels. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(1-2):161–9.
73. Bagó JR, Alieva M, Soler C, Rubio N, Blanco J. Endothelial differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in glioma tumors: implications for cell-based therapy. *Mol Ther*. 2013;21(9):1758–66.
74. Gronthos S, Franklin DM, Leddy H a, Robey PG, Storms RW, Gimple JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189(1):54–63.
75. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006;24(2):376–85.
76. Han TTY, Toutounji S, Amsden BG, Flynn LE. Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. *Biomaterials*. 2015;72:125–37.
77. Ribeiro CA, Fraga JS, Grãos M, Neves NM, Reis RL, Gimple JM, et al. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(3):18.
78. Zhang S, Danchuk SD, Bonvillain RW, Xu B, Scruggs BA, Strong AL, et al. Interleukin 6 mediates the therapeutic effects of adipose-derived stromal/stem cells in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Stem Cells*. 2014;32(6):1616–28.
79. Kono TM, Sims EK, Moss DR, Yamamoto W, Ahn G, Diamond J, et al. Human adipose-derived stromal/stem cells protect against STZ-induced hyperglycemia: Analysis of hASC-derived paracrine effectors. *Stem Cells*. 2014;32(7):1831–42.
80. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292–8.
81. Sorrell JM, Baber MA, Traktuev DO, March KL, Caplan AI. The creation of an in vitro adipose tissue that contains a vascular-adipocyte complex. *Biomaterials*. 2011;32(36):9667–76.
82. MacIsaac ZM, Shang H, Agrawal H, Yang N, Parker A, Katz AJ. Long-term in-vivo tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells. *Exp Cell Res*. 2012;318(4):416–23.
83. Agrawal H, Shang H, Sattah A, Yang N, Peirce S, Katz A. Human adipose-derived stromal/stem cells demonstrate short-lived persistence after implantation in both an immunocompetent and an immunocompromised murine model. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):142.
84. Follin B, Juhl M, Cohen S, Pedersen AE, Gad M, Kastrup J, et al. Human adipose-derived stromal cells in a clinically applicable injectable alginate hydrogel: Phenotypic and immunomodulatory evaluation. *Cytotherapy*. 2015;17(8):1104–18.

85. Lauvrud AT, Kelk P, Wiberg M, Kingham PJ. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells with enhanced angiogenic and adipogenic properties. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016. DOI: 10.1002/term.2147.
86. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014;22(4):862–72.
87. Liu HY, Chiou JF, Wu ATH, Tsai CY, Leu J Der, Ting LL, et al. The effect of diminished osteogenic signals on reduced osteoporosis recovery in aged mice and the potential therapeutic use of adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2012;33(26):6105–12.
88. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva Jr. WA, Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008;36(5):642–54.
89. Fukai F, Mashimo M, Akiyama K, Goto T, Tanuma S, Katayama T. Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp Cell Res*. 1998;242(1):92–9.
90. Karsan A, Yee E, Poirier GG, Zhou P, Craig R, Harlan JM. Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2-dependent and independent mechanisms. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1775–84.
91. Dwarki VJ, Belloni P, Nijjar T, Smith J, Couto L, Rabier M, et al. Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(4):1023–7.
92. Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*. 2011;117(2):459–69.
93. Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell*. 2012;47(2):169–82.
94. Van Der Sanden B, Dhobb M, Berger F, Wion D. Optimizing stem cell culture. *J Cell Biochem*. 2010;111(4):801–7.
95. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 1956;103(5):653–66.
96. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*. 1995;85(4):929–40.
97. Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, Inoue K, Kato H, Aoi N, et al. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytherapy*. 2007;9(8):738–45.
98. Wall ME, Bernacki SH, Loba EG. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1291–8.
99. Trivanovic D, Jaukovic A, Popovic B, Krstic J, Mojsilovic S, Okic-Djordjevic I, et al. Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sci*. 2015;141:61–73.
100. Valorani MG, Germani A, Otto WR, Harper L, Biddle A, Khoo CP, et al. Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell Tissue Res*. 2010;341(1):111–20.

101. Doorn J, Roberts SJ, Hilderink J, Groen N, van Apeldoorn A, van Blitterswijk C, et al. Insulin-Like Growth Factor-I Enhances Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2013;19:1817–28.
102. Pimentel TVCA. Influência de fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das características de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo; 2015.
103. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*. 2008;102:77–85.
104. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytom Part A*. 2010;77(1):22–30.
105. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello a, Fontanella E, et al. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*. 1993;81:1001–8.
106. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;1380–9.
107. Maumus M, Peyrafitte J-A, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumié A, Casteilla L, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes*. 2011;35(9):1141–53.
108. Koch CM, Reck K, Shao K, Lin Q, Joussen S, Ziegler P, et al. Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res*. 2013;23(2):248–59.
109. Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18(8):1201–10.
110. Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ. A Pericellular Collagenase Directs the 3-Dimensional Development of White Adipose Tissue. *Cell*. 2006;125:577–91.
111. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:378–86.
112. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. 2010;10(9):1886–90.
113. Albin A, Tosetti F, Li VW, Noonan DM, Li WW. Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9:498–509.
114. Eming S a., Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014;6(265):265sr6–265sr6.
115. Filali E El, Hiralall JK, van Veen HA, Stolz DB, Seppen J. Human liver endothelial cells, but not macrovascular or microvascular endothelial cells, engraft in the mouse liver. *Cell Transplant*. 2013;22(10):1801–11.
116. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273(21):13313–6.
117. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res*. 1999;247(2):495–504.

118. Nachman RL, Jaffe EA. Endothelial cell culture: Beginnings of modern vascular biology. Vol. 114, *Journal of Clinical Investigation*. 2004. p. 1037–40.
119. Freiman A, Shandalov Y, Rozenfeld D, Shor E, Segal S, Ben-David D, et al. Adipose-derived endothelial and mesenchymal stem cells enhance vascular network formation on three-dimensional constructs in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):5.
120. Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, Barry F, Nerem RM. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(9):2459–70.
121. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1751–61.
122. Rohringer S, Hofbauer P, Schneider KH, Husa AM, Feichtinger G, Peterbauer-Scherb A, et al. Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells. *Angiogenesis*. 2014;17(4):921–33.
123. Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL, et al. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: Critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res*. 2008;75(3):308–14.
124. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res*. 2008;103(2):194–202.
125. Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, et al. Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther*. 2004;11(3):253–9.
126. Van Damme a, Chuah MKL, Dell'accio F, De Bari C, Luyten F, Collen D, et al. Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats. *Haemophilia*. 2003;9(1):94–103.
127. Rosenberg JB, Greengard JS, Montgomery RR. Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(12):2689–95.
128. Lenting PJ, Christophe OD, Denis C V. Von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: Connecting the far ends. *Blood*. 2015;2019–28.
129. Kaufman RJ, Wasley LC, Davies M V, Wise RJ, Israel DI, Dorner a J. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol*. 1989;9(3):1233–42.
130. Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Yasumoto A, Ishiwata A, Sakata A, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(9):1802–13.
131. Hoebe RC, Fallaux FJ, Van Tilburg NH, Cramer SJ, Van Ormondt H, Briet E, et al. Toward gene therapy for hemophilia A: long-term persistence of factor VIII-secreting fibroblasts after transplantation into immunodeficient mice. *Hum Gene Ther*. 1993;4(2):179–86.
132. Brauker J, Frost GH, Dwarki V, Nijjar T, Chin R, Carr-Brendel V, et al. Sustained expression of high levels of human factor IX from human cells implanted within an immunisolation device into athymic rodents. *Hum Gene Ther*. 1998;9(6):879–88.
133. Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK, Kurachi K. Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins in vivo: human factor

- IX model. *J Gene Med*. 2003;5(1):11–7.
134. Richter WF, Bhansali SG, Morris ME. Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration. *AAPS J*. 2012;14(3):559–70.
135. Russell KE, Olsen EHN, Raymer RA, Merricks EP, Bellinger DA, Read MS, et al. Reduced bleeding events with subcutaneous administration of recombinant human factor IX in immune-tolerant hemophilia B dogs. *Blood*. 2003;102(13):4393–8.
136. Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, Fukazawa N, Kawanishi T, Kobayashi S, et al. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood*. 2016;127(13):1633–41.
137. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol*. 2002;1:1.
138. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2015;17:11–22.