NATHALIA CORREA ALMEIDA OLIVEIRA

**Determinação dos exossomos como os responsáveis pelo
efeito cardioprotetor parácrino das células tronco
mesenquimais pós-infarto agudo do miocárdio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo como requisito à
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Nathalia Corrêa de Almeida
Determinação dos exossomos como responsáveis pelo
efeito cardioprotetor parácrino das células tronco
mesenquimais pós-infarto agudo do miocárdio /
Nathalia Corrêa de Almeida Oliveira. -- São Paulo,
2019.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1. Infarto do miocárdio 2. Miócitos
cardíacos 3. Células-tronco 4. Tecido adiposo 5.
Exossomos 6. MicroRNAs

USP/FM/DBD-314/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade De São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES) e Fundação Zerbini.

Aos meus pais, Maria Auxiliadora e Júlio César, meu esposo Alan e meu filho Lucas por todo carinho e apoio ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pela dádiva da vida, por permitir que eu concluísse mais essa etapa da minha vida, obrigada por me dar forças e amparo em todos os momentos e por colocar pessoas para me ajudar nessa caminhada.

Aos meus pais, Maria Auxiliadora e Júlio Cesar por serem meu alicerce, por sempre estarem presentes e me apoiarem em todas as decisões da minha vida. Vocês são uma benção sem comparação.

A meu marido Alan pelo incansável apoio, compreensão, carinho e incentivo. Juntos somos mais fortes e temos provado isso a cada obstáculo. Amo você!

A meu filho Lucas que me ensinou sou capaz de muito mais coisas que eu jamais poderia imaginar. Que não é fácil conciliar a maternidade e doutorado, mais que é possível. Você é minha melhor parte, te amo até a lua ida e volta.

A meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pela confiança e oportunidade de desenvolver esse trabalho, pelos recursos e ferramentas para evoluir na minha jornada científica.

A minha querida amiga Camila, pela amizade sincera e convivência diária, por poder compartilhar a vida dentro e fora do laboratório.

Ao João pelas discussões e pela sempre disponibilidade em ajudar quer seja nos experimentos ou respondendo minhas inúmeras mensagens.

As amigas, Graça Rosas e Mariana Bozoklian presentes que ganhei no doutorado.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, em especial a Élida por toda dedicação e ajuda.

Aos colegas do laboratório experimental do Instituto do Coração por toda a ajuda com os experimentos realizados com os animais.

Ao Prof. Tucci e Ednei pela colaboração para realização desse trabalho.

A FAPESP pelo crédito e apoio financeiro (Processo 2017/17296-0).

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª edição. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1.	<i>Introdução</i>	1
	<i>As doenças cardiovasculares – o Infarto Agudo do Miocárdio</i>	1
	<i>Mecanismos celulares e moleculares do reparo cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio</i> ...	2
	<i>A inflamação e o papel dos macrófagos no reparo cardíaco</i>	3
	<i>Fibroblastos e miofibroblastos na lesão cardíaca</i>	5
	<i>Células-tronco e a terapia celular</i>	6
	<i>Células-tronco mesenquimais</i>	7
	<i>Exossomos</i>	11
	<i>miRNAs</i>	14
	<i>miRNAs e o infarto agudo do miocárdio</i>	15
	<i>Exossomos – Potenciais compostos terapêuticos</i>	17
2.	<i>Objetivos</i>	18
3.	<i>Métodos</i>	19
	<i>3.1 Extração, cultura e caracterização das células mesenquimais do tecido adiposo</i>	19
	<i>3.2 Extração e caracterização dos exossomos derivados das células mesenquimais de tecido adiposo</i>	21
	<i>3.3 Extração de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais microvasculares cardíacas</i>	23
	<i>3.4 Extração, cultivo e polarização de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos</i>	25
	<i>3.5 Ensaio de Proliferação celular por High Content Screening (HCS)</i>	26
	<i>3.6 Ensaio de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo</i>	28
	<i>3.7 Ensaio de Formação de Tubo</i>	29
	<i>3.8 Ensaio de expressão proteica por High Content Screening (HCS)</i>	29
	<i>3.9 Análise da Expressão Gênica</i>	30
	<i>3.10 Secreção de citocinas por membrana array</i>	33

3.11	<i>Análise de expressão dos miRNAs.....</i>	34
3.12	<i>Modelo Animal de Infarto do miocárdio.....</i>	35
3.13	<i>Avaliação da função cardíaca – exame de Ecocardiografia</i>	36
3.14	<i>Análises histológicas</i>	37
3.15	<i>Análises estatísticas.....</i>	39
4.	<i>Resultados</i>	40
4.1	<i>Caracterização das culturas de rASCs por análise de marcadores de superfície</i>	40
4.2	<i>Caracterização dos exossomos de rASCs</i>	41
4.3	<i>Efeito dos exossomos derivados de rASCs nas células cardíacas</i>	42
4.4	<i>Meio condicionado de macrófagos tratados com exossomos é capaz de induzir proliferação de cardiomiócitos submetidos à hipóxia.....</i>	52
4.5	<i>Efeitos dos exossomos sobre o reparado do infarto do miocárdio em ratos</i>	54
4.6	<i>Exossomos derivados de rASCs contêm miRNAs envolvidos na regeneração cardíaca ..</i>	60
5.	<i>Discussão.....</i>	63
6.	<i>Conclusões.....</i>	74
7.	<i>Referências Bibliográficas</i>	75
8.	<i>ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética.....</i>	92

LISTA DE SIGLAS & ABREVIATURAS

ACTA2 – Gene codificante de α -actina de músculo liso

ADS – Solução salina tamponada com HEPES, livre de cálcio

AGO – Proteína Argonauta

AMI – do inglês, *Acute myocardial infarction*

AKT – Proteína quinase B

ARG1 – Gene codificante de Arginase-1

ARL2 - Fator de ribosilação de ADP 2

ASC – *Adipose Tissue Stromal Cells/Stem Cells*

APC – do inglês, *Allophycocyanin* (Aloficocianina)

ATP – Adenosina trifosfato

BMDMØ – do inglês, *Bone Marrow-Derived Macrophages* (Macrófagos derivados da medula óssea)

BrdU – Bromodesóxiuridina

BCA – Ácido bicinconínico

BSA – do inglês, *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)

CCL-2 – do inglês, *C-C motif chemokine ligand 2* (Proteína quimioatrativa de monócito-1)

CD – do inglês, *Cluster of Differentiation* (grupamento de diferenciação)

CD9 – Tetraspanina-29

CD29 – Integrina- β_1

CD31 – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

CD45 – Tirosina-fosfatase receptora de tipo C

CD63 – Tetraspanina-30

CD68 - Antígeno de Macrófagos

CD73 – Ecto-5'-nucleotidase

CD81 – Tetraspanina-28

CD90 – Antígeno-1 de diferenciação de timócito (Thy-1)

cDNA –DNA complementar

CEMC – Células Endoteliais Microvasculares Cardíacas

CM - Cardiomiócitos

CO₂ – Gás carbônico

COL1A1 – Gene codificante de colágeno do tipo 1
COL1A2 – Gene codificante de colágeno do tipo 2
COL3A1 – Gene codificante de colágeno do tipo 3
Ct – do inglês, *Threshold cycle*
DAB - 3', 3-Diaminobenzidina
DAPI - do inglês, *4,6-Diamidino-2-Phenylindole* (4',6'-diamino-2-fenil-indol)
DGCR8 – do inglês, *Microprocessor Complex Subunit* (proteína 8 da região crítica da síndrome de DiGeorge)
DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA- do inglês, *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP – do inglês, *Deoxynucleoside Triphosphate* (trifosfato de desóxinucleosídeos)
DP – desvio padrão da media
dUTP - do inglês, *Deoxyuridine Triphosphate* (Trifosfato de desoxiuridina)
DPBS – do inglês, Dulbecco's PBS
DTT – Ditionitrito
ECGS – do inglês, *Endothelial Cell Growth Supplement* (Suplemento de crescimento endotelial)
ELN – gene codificante de elastina
FBN1 – gene codificante de fibrilina 1
FBS – do inglês, *Fetal Bovine Serum* (Soro fetal bovino)
FGF-2 – do inglês, *Fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblastos)
FITC – do inglês, *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)
GAPDH – do inglês, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato)
HCS – do inglês, *High Content Screening* (Triagem de alto conteúdo)
HRS – do inglês, *Horse Serum* (Soro de cavalo)
HRP – do inglês, *Horseradish peroxidase* (Peróxido de hidrogênio oxidoreductase)
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
IFN-γ – Interferon-γ

IL – Interleucina

IP – Iodeto de Propídio

KCl – Cloreto de potássio

Ki67 – Antígeno nuclear, marcador de proliferação

LDL – do inglês, *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

M1 – Macrófagos classicamente ativados

M2 – Macrófagos alternativamente ativados

M-CSF – do inglês, *Macrophage-Colony Stimulating Factor*
(Fator estimulante de colônia de macrófago)

Mexo – Macrófagos tratados com exossomos

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MIP-1α - do inglês, *Macrophage Inflammatory Proteins 1α*
(proteínas inflamatórias de macrófagos 1α)

miRNA – microRNA

mRNA – do inglês, *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

MSC – Células-tronco mesenquimais

MVB – do inglês, *Multivesicular bodies* (corpos multivesiculares)

NaCl – Cloreto de sódio

NBCS – do inglês, *Newborn Calf Serum* (Soro de bezerro recém-nascido)

O₂ – Gás oxigênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – do inglês, *Phosphate Buffered-Salin* (Solução salina tamponada com fosfato)

PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDGF – do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*
(fator de crescimento derivado de plaquetas)

PE – do inglês, *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)

PFA – Paraformaldeído

PR – do inglês, *Picrosírius-Red*

rASC – do inglês, *Rat Adipose Tissue Stromal Cells*

RISC – do inglês, *RNA-induced silencing complex*
(complexo silenciador induzido por RNA)

RNA – do inglês, *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

RPM – Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

rTdT – do inglês, *Desoxynucleotidil transferase terminal*
(terminal desoxinuceotidil transferase)

RT-qPCR – do inglês, *real time-quantitative* PCR
(PCR quantitativo em tempo real)

SEM – do inglês, *Standard Error of the Mean*
(erro padrão da média)

SMA – *Smooth Muscle Actin* (Actina de músculo liso)

TA – Temperatura Ambiente

TGF- β – do inglês, *Transforming Growth Factor- β* (Fator de crescimento transformante- β)

TNF- α – do inglês, *Tumor Necrosis Factor- α*
(Fator de necrose tumoral- α)

TSG101 – do inglês, *Tumor Susceptibility Gene 101 protein*
(Proteína 101 de susceptibilidade a tumor)

VE – Ventrículo esquerdo

VEGF - do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*
(fator de crescimento do endotélio vascular)

XPO-5 – do inglês, *Exportin -5* (Proteína exportina-5)

LISTA DE SÍMBOLOS

> – menor que

± – mais ou menos

% – porcentagem

°C – grau Celsius

α – letra grega alfa

β – letra grega beta

γ – letra grega gama

Δ – letra grega delta

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

cm² – centímetro quadrado

cm³ – centímetro cúbico

g – força centrífuga

g – grama

h – hora

Kg – kilograma

mg – miligrama

mm³ – milímetro cúbico

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

nm – nanômetro

p – nível descritivo de probabilidade do teste

s – segundos

v/v - volume por volume

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema representativo do processo de formação dos exossomos. Endossomos primários dão origem aos corpos multivesiculares, que darão origem aos exossomos. 13
- Figura 2: Perfil imunofenotípico das rASCs. Os histogramas mostram a expressão dos marcadores celulares positivos CD73, CD90 e CD29 e ausência de marcação para CD45 e CD31. A linha preta representa as populações de rASCs e em cinza o isotipo correspondente..... 40
- Figura 3: Identificação dos marcadores típicos de exossomos. A expressão de CD81 pode ser observada no histograma. A população de exossomos está representada pela linha preta, enquanto o isotipo específico está em cinza. .. 41
- Figura 4: Imagem representativa dos exossomos em movimento browniano. . 42
- Figura 5: Exossomos derivados de ASC estimulam o aumento na taxa de proliferação dos CM quando submetidos às 24h de hipóxia. Imagens representativas (A) do grupo controle e (B) tratados com exossomos. Os cardiomiócitos foram marcados com tropomiosina sarcomérica (verde), Ki67 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As barras indicam (média $\pm$ DP) elevação da taxa de proliferação dos cardiomiócitos em hipóxia (C) e em normóxia (D) tratados com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS). ** $p < 0,01$ 43
- Figura 6: Caracterização das células endoteliais microvasculares cardíacas. Morfologia da cultura de células endoteliais microvasculares cardíacas (A). Expressão dos marcadores de superfície analisados por citometria de fluxo (B-D). A população de CEMC está representada pela linha preta e em cinza o isotipo correspondente. 44
- Figura 7: Efeito do tratamento com exossomos nas células endoteliais microvasculares cardíacas. (A) Imagens representativas das fases do ciclo celular, G0-G1 em vermelho, S em verde e G2 em azul. (a) grupo controle e (b) tratados com exossomos. (B e C). As barras indicam (média $\pm$ DP) aumento da indução de proliferação nas CEMC tratadas com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS). * $p < 0,05$ 45
- Figura 8: Exossomos derivados de ASC induzem a formação de estruturas semelhantes a capilares *in vitro*. Imagens representativas (A) do grupo controle e (B) tratados com exossomos (C) tratados com VEGF. Após 8h de plaqueamento das células endoteliais da microvasculatura cardíaca, é possível observar a formação de tubos. As barras indicam (média $\pm$ DP) aumento do número de tubos formados nas CEMC tratados com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS) (D). ** $p < 0,01$ 46
- Figura 9: Exossomos derivados de ASC reduzem a taxa de proliferação dos fibroblastos quando submetidos à hipóxia por 24h. Imagens representativas (A) grupo controle e (B) tratados com exossomos. A cultura de fibroblastos foi

marcada com Ki67 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As barras indicam (média $\pm$ DP) da redução da taxa de proliferação dos fibroblastos cardíacos tratados com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS) (C). *** $p < 0,0001$ 47

Figura 10: Exossomos derivados de ASC inibem a transdiferenciação de fibroblastos, induzidos por TGF- β , em miofibroblastos. A expressão dos níveis de mRNA (A) α -SMA, (B) Colágeno I e (C) Colágeno III foi determinada pelo ensaio de RT-qPCR. As barras indicam (média $\pm$ DP). ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação aos fibroblastos transdiferenciados por TGF- β 48

Figura 11: Exossomos inibem a expressão de α -SMA de fibroblasto induzidos a transdiferenciação em miofibroblastos. Imagens representativas (A e B) do grupo tratado com TGF- β (C e D) tratados com TGF- β e exossomos. Os fibroblastos diferenciados com TGF- β foram marcados com α -SMA (verde) e os núcleos com DAPI (azul). (E) Intensidade de expressão α -SMA foi avaliada por imunofluorescência. As barras indicam (média $\pm$ DP). # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle * $p < 0,05$ em relação aos fibroblastos transdiferenciados com TGF- β 49

Figura 12: Cultura de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos, cultivados por sete dias com a citocina M-CSF. (A) controle pró-inflamatório cultivado com IFN- γ (B) controle anti-inflamatório cultivado com IL-4 e (C) macrófagos cultivados com 50ug/ml de exossomos, respectivamente (10x)... 50

Figura 13: Exossomos derivados de ASC induzem a polarização de macrófagos derivados de medula óssea. A expressão dos níveis de mRNA (A) *IL1- β* , (B) *TNF- α* , (C) *NOS2*, (D) *Arginase 1*, (E) *TGF- β* e (F) *CCL2* foi determinada pelo ensaio de RT-qPCR. As barras indicam (média $\pm$ DP). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle (macrófagos não polarizados).51

Figura 14: Meios condicionados de MxO apresentam citocinas pró e anti-inflamatórias. As citocinas foram classificadas de acordo com cada perfil analisado. Citocinas secretadas por macrófagos pró-inflamatórios (A) Citocinas secretadas por macrófagos anti-inflamatórios (B). Principais citocinas secretadas pelos macrófagos tratados pelos exossomos (C). Citocinas secretadas pelos exossomos derivados de rASCs (D). A-D, n = 5 / cada..... 52

Figura 15: Meio condicionado dos macrófagos tratados com exossomos aumenta a taxa de proliferação dos CM quando submetidos às 24h de hipóxia. Imagens representativas (A) do grupo controle, (B) meio condicionado dos macrófagos M1, (C) meio condicionado dos macrófagos M2 e (D) meio condicionado dos macrófagos tratados com exossomos. Os cardiomiócitos foram marcados com tropomiosina sarcomérica (verde), Ki67 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As barras indicam (média $\pm$ DP) elevação da taxa de proliferação dos cardiomiócitos tratados com meios condicionados de macrófagos em comparação ao controle (E). ** $p < 0,01$ 53

Figura 16: Avaliação da função cardíaca via ecocardiográfica. (A) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo. (B) Fração de encurtamento. As barras representam (média $\pm$ DP). Sham (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13). 54

Figura 17: Avaliação histológica do tamanho do infarto. As barras representam (média $\pm$ DP) do perímetro do ventrículo esquerdo com colágeno transmural (cicatriz). Sham (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13). 55

Figura 18: Avaliação morfométrica. (A) Análise histológica do perímetro do ventrículo esquerdo (VE) em milímetros. (B) Espessura do septo intraventricular nos diferentes tratamentos. As barras representam (média $\pm$ DP). Sham, (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13). 56

Figura 19: Avaliação histológica da espessura da cicatriz do ventrículo esquerdo (VE). (A) Quantificação da espessura da cicatriz, as barras representam (média $\pm$ DP). (B) Imagem histológica da borda do infarto, as fibras de colágeno foram observadas através da marcação do Picrossírius Red. Sham, (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13). 57

Figura 20: Avaliação das fibras de colágeno na área infartada. As fibras de colágeno foram observadas através da marcação do Picrossírius Red. As imagens indicam a marcação positiva (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação das fibras de colágeno, normalizadas pela área total de tecido. As barras representam (média $\pm$ DP). 58

Figura 21: Avaliação das fibras de colágeno na área remota. As fibras de colágeno foram observadas através da marcação do Picrossírius Red. As imagens indicam a marcação positiva (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação das fibras de colágeno, normalizadas pela área total de tecido. As barras representam (média $\pm$ DP). 58

Figura 22: Exossomos reduzem a apoptose nos corações infartados. As imagens indicam a marcação positiva para os núcleos apoptóticos. (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação de núcleos apoptóticos, normalizados pela área total de tecido. As barras representam (média $\pm$ DP). 59

Figura 23: Infiltrado de macrófagos no tecido cardíaco pós-lesão. O infiltrado foi avaliado pela marcação positiva de células CD68. (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação de células CD68 positiva, normalizadas pela área total de tecido. As barras representam (média $\pm$ DP). 60

Figura 24: Os cinco miRNAs presentes nos exossomos de rASC e na ressecção de ratos neonatais de um dia de vida. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR	32
Tabela 2: Tamanho e concentração dos exossomos derivados de rASCs	42
Tabela 3: miRNAs derivados de exossomos encontrados na análise de microarray	61

RESUMO

Oliveira N. *Determinação dos exossomos como os responsáveis pelo efeito cardioprotetor parácrino das células tronco mesenquimais pós-infarto agudo do miocárdio*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

O suprimento inadequado do fluxo sanguíneo para o tecido cardíaco e a morte de cardiomiócitos são eventos importantes na deterioração cardíaca pós-infarto do miocárdio (IAM), que associados a baixa capacidade regenerativa dos cardiomiócitos contribuem com as altas estatísticas de morbi-mortalidade associada às doenças cardiovasculares em todo o mundo. O transplante de células estromais do tecido adiposo adulto (ASC) pós-IAM resulta em melhoras estruturais e funcionais decorrentes da diminuição de apoptose em cardiomiócitos, aumento da densidade vascular e redução/modificação da fibrose e da cicatriz. Entretanto, a baixa eficiência da retenção das ASCs transplantadas e a incapacidade de geração de novos cardiomiócitos limitam o efeito das ASCs na regeneração cardíaca, mas ainda assim as ações paracrinas contribuem para a reparação do órgão. Os efetores dessa resposta não foram elucidados e por isso, testamos a hipótese de que exossomos derivados de ASCs contribuem para os efeitos cardioprotetores do transplante de células mesenquimais. Utilizamos as células alvo cardíacas sob condições que mimetizam o microambiente do tecido isquêmico para verificar a hipótese e por fim a validamos no organismo inteiro no modelo de infarto experimental em ratos. Os exossomos derivados de ASC influenciaram processos chave na reparação cardíaca, promoveram a proliferação de cardiomiócitos neonatais (CM) submetidos à hipóxia, além de induz proliferação e potencializar a formação de tubos de células endoteliais microvasculares cardíacas sob normóxia (CMEC). Também modularam o fenótipo de fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia, induzindo redução na proliferação e atenuação da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, bem como diminuiu a expressão de colágeno do tipo I e III. Além disto, induziram a diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea e o meio condicionado desses

macrófagos diferenciados promoveram proliferação nos cardiomiócitos neonatais. Finalmente, validamos o potencial reparativo dos exossomos de ASC *in vivo* para avaliar o potencial de modular a reparação cardíaca em ratos pós-IAM e observamos inibição da apoptose em cardiomiócitos e espessamento da cicatriz que sugere que a mesma apresenta tecido viável indicando um remodelamento pós o IAM menos acentuado. A fim de entender qual o mecanismo por trás da cardioproteção mediada por exossomos, foi realizado um ensaio de microarranjo de miRNAs dos exossomos extraídos de ASC e utilizando uma abordagem *in silico* para enriquecimento, selecionamos os microRNAs das famílias miR-199a, miR-146b, miR-425 e miR196a como possíveis mediadores dos efeitos cardioprotetores para serem validados isoladamente e em conjunto futuramente. Em síntese, fornecemos evidências para o papel modulatório dos exossomos na proliferação de células cardíacas e endoteliais, na diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos, e na diferenciação de macrófagos que são eventos importantes para o reparo cardíaco e que em muito recapitulam o observado em resposta ao enxerto de ASC. Os dados *in vivo* corroboram estes achados *in vitro* e suportam a hipótese de que os exossomos são efetores cardioprotetores da sinalização parácrina de ASC.

Descritores: infarto do miocárdio, miócitos cardíacos, células-tronco, tecido adiposo e exossomos.

ABSTRACT

Oliveira N. *Exosomes as key players in the paracrine cardioprotective effects of mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction*. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

The inappropriate blood supply to the heart tissue and cardiomyocyte death are important events in cardiac deterioration post-myocardial infarction (AMI), which combined with cardiac myocytes regeneration inability, contribute to the high morbidity and mortality statistics associated with cardiovascular diseases worldwide. Post-myocardial infarction transplantation of adult adipose tissue stromal cells (ASC) results in structural and functional improvements due to decreased apoptosis in cardiomyocytes, increased vascular density and reduced/ modified a fibrotic scar. These effects are mediated by a paracrine effect exerted by ASC in the infarcted myocardium. However, the effectors of this response are yet to be elucidated. Thus, we tested the hypothesis that ASC-derived exosomes contribute to the cardioprotective effects of mesenchymal cell transplantation. To do so, we used cardiac target cells under conditions that mimic the ischemic tissue microenvironment and finally validate the results in the whole organism in the experimental rat infarction model. We found that ASC-derived exosomes influence key processes in cardiac repair, such as proliferation of hypoxia-induced neonatal cardiac myocytes (CM), proliferation, and formation of normoxic cardiac microvascular endothelial cell (CMEC) tubes. They also modulated the phenotype of hypoxia-induced cardiac fibroblasts, attenuating their proliferation and differentiation into myofibroblasts, as well as reduced synthesis of type I and III collagens expression. Additionally, ASC-derived exosomes induced the differentiation of bone marrow-derived macrophages and treatment of neonatal cardiac myocytes with the conditioned media of these differentiated macrophages promoted cell cycle progression. Finally, we validated the reparative potential of ASC exosomes *in vivo* to assess their potential of modulating cardiac repair in post-AMI rats and observed apoptotic inhibition in cardiac myocytes and presence of viable tissue in a thicker scar when compared to sham, suggesting

that treatment with exosomes culminated in a less pronounced post-AMI cardiac remodeling. In order to determine the underlying mechanism of the exosome-associated cardioprotective response, a microarray assay of the exosome-extracted miRNAs from ASC was performed followed by an *in silico* enrichment approach, through which we selected the miRNA families miR-199a, miR-146b, miR-425 e miR196a as possible mediators of exosome cardioprotection to be validated in future. In synthesis, we provided evidence of a modulatory role of exosomes in the proliferation of cardiac and endothelial cells, fibroblast differentiation to myofibroblasts, and macrophage differentiation, key events taking place during cardiac repair and that recapitulate the observed outcomes in response to ASC graft post-AMI. *In vivo* data corroborate the *in vitro* findings and support the hypothesis that exosomes are cardioprotective effectors of the ASC paracrine signaling.

Keywords: myocardial infarction, myocytes cardiac, stem cells, adipose tissue and exosomes.

1. Introdução

As doenças cardiovasculares – o Infarto Agudo do Miocárdio

Todos os anos milhares de pessoas vão a óbito devido a doenças cardiovasculares, que constituem a principal causa de mortalidade mundial nos últimos 15 anos. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que em 2016 as doenças cardiovasculares foram responsáveis por um total de 17,9 milhões de mortes (1) e no Brasil, os dados do departamento de informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) de 2014 revelam exatamente o mesmo cenário mundial, sendo as doenças cardiovasculares responsáveis por aproximadamente 30 % das mortes no país (2). Dados obtidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia através de um indicador do número de mortes por doenças cardiovasculares estimam que em 2017 foram 383 mil óbitos, sendo mais de mil mortes por dia e cerca de uma morte a cada 90 segundos (3). Dentre as doenças cardiovasculares o acidente vascular encefálico e o infarto agudo do miocárdio (IAM) são os principais responsáveis pela alta mortalidade, sendo fatores alarmantes.

A doença isquêmica do miocárdio é responsável por 9,4 milhões de óbitos anuais, representando 16,6 % das mortes do mundo todo (1). No Brasil a estimativa é de 100 mil casos anuais. De acordo com dados computacionais da Associação Americana do Coração, a cada 40 segundos um americano terá um IAM e desses, 14 % irão a óbito (4). O IAM geralmente ocorre devido a uma mudança súbita e imprevisível da placa aterosclerótica estável, que sofre uma ruptura ou erosão. Consequentemente, ocorre a formação de um trombo, o qual pode ocluir parcialmente ou totalmente as artérias coronarianas. A principal manifestação do infarto agudo do miocárdio é *angina pectoris*, consequência de um desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio miocárdico, resultando em isquemia miocárdica. Estima-se que um período de 20-30 min de isquemia já é suficiente para induzir alterações drásticas, como parada da fosforilação oxidativa e perturbação do equilíbrio iônico nos cardiomiócitos. Logo, uma isquemia miocárdica prolongada gera danos

celulares irreversíveis, como a morte de bilhões de cardiomiócitos e, consequentemente, alteração na homeostasia do órgão (5). Uma vez que cardiomiócitos adultos apresentam baixíssima capacidade regenerativa (aproximadamente 1 % dos cardiomiócitos entram em ciclo celular por ano) (6), após sua perda, o coração não é capaz de gerar cardiomiócitos suficientes para preencher a área lesionada. Assim, o reparo da área infartada será realizado por fibroblastos cardíacos, formando um tecido fibrótico, o que mantém a integridade estrutural do coração, prevenindo ruptura, mas que é incapaz de desempenhar função contrátil, levando a um comprometimento da função cardíaca global em longo prazo (7, 8).

O remodelamento ventricular pós-infarto está diretamente relacionado com o prognóstico desses pacientes. Alterações estruturais, funcionais e geométricas que envolvem tanto o miocárdio infartado quanto o miocárdio não infartado levam à dilatação da câmara, aumento da esfericidade do ventrículo e disfunção cardíaca, um quadro que pode evoluir para insuficiência cardíaca (9).

Mecanismos celulares e moleculares do reparo cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio

O coração adulto de mamíferos é composto por uma complexa e interdependente comunidade de células. Além dos cardiomiócitos, o coração contém inúmeras células intersticiais como os fibroblastos, células vasculares (células endoteliais, pericitos e células musculares lisas) e células imunológicas (macrófagos, mastócitos e células dendríticas) (10). Todos esses tipos de células contribuem para a estrutura e função normais do coração, além de desempenharem papel importante no processo de reparo cardíaco, uma vez que cardiomiócitos são as células mais prejudicadas pelo evento isquêmico devido à sua alta demanda energética. Durante o infarto, a oclusão das artérias coronarianas resulta em uma imediata parada do metabolismo aeróbico dos cardiomiócitos que passam a usar vias alternativas para gerar ATP (como a glicólise anaeróbica), resultando em um rápido acúmulo de lactato no miocárdio isquêmico. Caso o fluxo sanguíneo não seja restaurado rapidamente, milhões

de cardiomiócitos morrem, quer seja por necrose ou apoptose. A necrose dos cardiomiócitos ativa uma intensa cascata inflamatória que dará o início ao processo de reparo cardíaco (5).

O reparo do coração infartado depende de uma sequência de eventos que podem ser classificados em três fases distintas, mas que se sobrepõem: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de maturação (11). A fase inflamatória é caracterizada pela ativação de mecanismos da imunidade inata, que envolvem a expressão de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias, levando ao recrutamento de neutrófilos e células mononucleares ao sítio da lesão. Estas células limpam a área infartada de células mortas e dos restos de matriz extracelular, preparando o tecido para a formação da escara fibrótica (9, 12). A supressão da sinalização pró-inflamatória dá lugar à fase proliferativa, caracterizada por aumento no número de fibroblastos, que se diferenciam em miofibroblastos e secretam matriz extracelular rica em colágenos do tipo I e III. Já a fase de maturação é associada à apoptose das células reparativas e pela formação da escara fibrótica, onde o ventrículo sofre dilatação para manutenção da função ventricular manter e os segmentos não infartados passam por extensa remodelação devido à sobrecarga de pressão e volume (13).

A inflamação e o papel dos macrófagos no reparo cardíaco

A inflamação ocorre naturalmente em resposta a lesão e é pré-requisito para a remodelação, regeneração e formação de cicatriz. O aumento das concentrações séricas de moléculas conhecidas como associadas ao perigo quando liberadas após necrose tecidual, promovem a ativação do sistema imune inato (14, 15).

Essa intensa, porém transiente reação inflamatória é caracterizada pela infiltração de células mononucleares e mastócitos no miocárdio lesado e pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (como fator de necrose tumoral [TNF], IL-1 β e membros da família IL-6) que irão modular essa resposta (16). Após o recrutamento de monócitos para as regiões infartadas, essas células

amadurecem e se diferenciam em macrófagos impulsionados por citocinas, incluindo M-CSF (fator de estimulação de colônias de macrófagos) (17).

Tradicionalmente, os macrófagos no infarto são vistos como células fagocitárias que eliminam as células mortas e os restos de matriz extracelular da região infartada, além de exercerem papéis regulatórios na inflamação, fibrose e angiogênese. No ambiente dinâmico do infarto, os macrófagos podem adquirir fenótipos diferentes (18). O conceito sugerindo recrutamento de duas populações polarizadas de macrófagos (classicamente ativados [M1] e alternativamente ativados [M2]) no infarto representa um modelo representativo do repertório de macrófagos encontrados *in vivo* (19).

Na cinética da resposta inflamatória, observa-se um predomínio de uma população em repressão da outra. Em camundongos, na fase aguda do infarto (aproximadamente no terceiro dia pós-lesão), ocorre um influxo de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios M1, que fagocitam os detritos e secretam citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , resultando em amplificação da resposta inflamatória. Na fase de reparo, verifica-se a proeminente presença de macrófagos M2, que secretam citocinas imunomodulatórias como IL-10 e TGF- β , além de estimularem a angiogênese (10). A repressão oportuna da inflamação é necessária para permitir a substituição tecidual e evitar respostas exacerbadas, que podem acentuar a lesão e promover um remodelamento e disfunções adversas, tais como perda de cardiomiócitos, supressão da função sistólica, aumento dos processos de degradação da matriz levando à dilatação da câmara, aumento da degradação tecidual causando perda da integridade da parede ventricular e ruptura cardíaca (9, 10, 13).

Fibroblastos cardíacos também participam da inflamação e são os principais impulsionadores da reparação fibrótica, uma vez que também secretam TGF- β , uma molécula que está criticamente envolvida na supressão da inflamação e ativação de um programa pro-fibrótico nos próprios fibroblastos (20).

Fibroblastos e miofibroblastos na lesão cardíaca

Os fibroblastos cardíacos representam aproximadamente 10% de todas as células cardíacas e apresentam um papel crucial no reparo cardíaco pós-infarto (21). Eles possuem diversas funções, dentre elas: manutenção da integridade estrutural do coração, estimular a angiogênese e modulação da inflamação. A fim de desempenharem essas funções, fibroblastos exibem notável plasticidade, passando por alterações fenotípicas dinâmicas em resposta a mudanças no microambiente (22), além de responderem a uma variedade de estímulos mecânicos, elétricos e químicos fundamentais à manutenção da função cardíaca normal (23). Assim, o papel dos fibroblastos se estende desde a regulação da inflamação, até a sua contribuição para a formação de cicatriz e remodelação da matriz extracelular (13). Embora tradicionalmente vistos como meras células produtoras de matriz extracelular, durante as primeiras 24-72 horas após o infarto, os fibroblastos adquirem um fenótipo pró-inflamatório, capaz de secretar citocinas, quimiocinas e enzimas remodeladoras da matriz extracelular (24). Durante a fase proliferativa da cicatrização, diversas células (macrófagos, mastócitos e cardiomiócitos) liberam fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) (25), angiotensina II e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)(26, 27), que induzem intensa proliferação de fibroblastos intersticiais, tornando-os o tipo celular predominante no miocárdio infartado (13, 22). A supressão da síntese de sinais pró-inflamatórios como IL-1 β , a expressão e deposição de matriz extracelular como fibronectina ED-A, e a produção e secreção de TGF- β , desencadeiam o aparecimento de miofibroblastos no local da lesão, caracterizados pela expressão de actina de músculo liso α -SMA (28; 29, 30).

Após os fibroblastos serem ativados para se diferenciar em miofibroblastos, esses convergem para região lesada e aceleram a síntese e deposição de colágeno, em especial o colágeno do tipo III, observado já no terceiro dia pós-indução de infarto em ratos (31). A produção de colágeno tipo I é mais lenta e os níveis máximos dessa proteína são menores que os do colágeno tipo III (32). Além disso, miofibroblastos também são responsáveis

por regular a deposição de outros componentes da matriz extracelular como fibronectina, laminina e proteoglicanos e de inibidores da degradação da matriz, como as metaloproteinases. Com isso, ocorre substituição dos cardiomiócitos necróticos e formação da cicatriz de fibrose para manter a integridade do coração infartado (7, 22, 33).

Células-tronco e a terapia celular

Devido ao avanço nas últimas três décadas em estratégias terapêuticas para o tratamento do IAM como, por exemplo, a terapia de reperfusão ou de restauração do fluxo sanguíneo, angioplastia coronariana, cirurgia de revascularização e a introdução de tratamento medicamentoso com novos fármacos, tem se observado uma redução significativa da mortalidade durante os primeiros 30 dias do pós-lesão (34). O aprimoramento da terapia de reperfusão precoce, por exemplo, teve um impacto muito positivo na sobrevivência dos pacientes pós-infarto, pois contribuiu para resolver o problema da isquemia miocárdica, como a redução do tamanho do infarto (35). Contudo, essas terapias não foram capazes de atuar na área infartada repondo os cardiomiócitos perdidos, o que gera um aumento no risco de remodelamento do ventrículo esquerdo em consequência da perda de tecido contrátil, podendo levar a um quadro de insuficiência cardíaca (36).

Nesse contexto, terapias adjuvantes, como a administração de células-tronco no coração infartado, ganharam destaque nas últimas décadas por serem potenciais agentes terapêuticos (37). Acreditava-se que essas terapias alternativas poderiam de certa forma, reduzir a perda de cardiomiócitos – reduzindo a morte celular, estimulando a revascularização da região isquêmica através da angiogênese e também estimulando a regeneração dos cardiomiócitos, a fim de diminuir a escara de fibrose (35).

As células-tronco são células indiferenciadas capazes de se dividir e diferenciar em diversos tipos celulares (38). Existem vários tipos de células-tronco, que são classificadas em dois grupos principais: células-tronco embrionárias, que se originam da massa celular interna do blastocisto, e

células-tronco adultas, que estão presentes em diferentes tecidos (39). A ideia de que as células-tronco teriam a capacidade de se diferenciar em cardiomiócitos e com isso substituir os que foram perdidos durante o evento isquêmico, gerou muita especulação no final da década dos anos 90, cogitando-se o que teria sido impensável até então, a regeneração miocárdica (40). Nesse cenário, as células-tronco embrionárias se apresentaram como perfeitas candidatas, uma vez que isoladas possuem a capacidade de se dividir indefinidamente e de se diferenciar em qualquer tipo celular (41). Embora essas células sejam incapazes de diferenciação espontânea em cardiomiócitos, elas podem ser direcionadas para se diferenciarem em cardiomiócitos ou células progenitoras (34). Todavia, questões éticas e o risco de surgimento de teratomas levaram à busca pelo uso de células-tronco adultas ou progenitores celulares como alternativas (42, 43).

As células-tronco adultas podem ser classificadas em dois grupos principais: células-tronco hematopoiéticas, que se diferenciam em células sanguíneas, e células-tronco mesenquimais (MSCs) que podem se diferenciar numa variedade de tipos celulares (37). O uso das MSCs para fins terapêuticos surge então como uma fonte interessante por serem geneticamente estáveis, apresentarem possibilidade de cultivo *in vitro* com alta capacidade de expansão e facilidade de isolamento, além de possuírem fortes propriedades imunomoduladoras (44).

Células-tronco mesenquimais

Entre os tipos celulares usados como terapêutica celular na regeneração cardíaca, as MSCs são uma das mais atraentes por várias razões. Elas estão livres das preocupações éticas, oncológicas e imunológicas das células-tronco embrionárias (45); podem ser facilmente isoladas de diferentes tecidos, incluindo medula óssea, sangue periférico, cordão umbilical e tecido adiposo (46) e apresentam fácil crescimento e expansão em cultura, tolerância à hipóxia e baixo potencial imunogênico. Além disso, as MSCs secretam fatores

angiogênicos e a atividade imunossupressora dessas células foi evidenciada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (46-48).

As MSCs são células não hematopoiéticas extremamente raras, representando 0,001% a 0,01% das células nucleares da medula óssea (49). Além da medula óssea, elas também podem ser encontradas em outros tecidos, tais como tecido adiposo, fígado, pulmões, tendões, polpa dentária, placenta, cordão umbilical, e também estão presentes em alguns fluidos biológicos, como leite materno, urina e amniótico (50). Apesar de raras, essas células são facilmente isoladas da medula óssea e podem ser cultivadas *in vitro*.

As MSCs apresentam potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, tanto *in vitro* quanto *in vivo* mediante o estímulo de fatores de diferenciação (49). Em 1999, Makino e colaboradores demonstraram que as MSCs eram capazes de gerar cardiomiócitos *in vitro* (51), o que fez com que essas células emergissem como uma das mais promissoras células-tronco para o tratamento de doenças cardiovasculares (49). Entretanto, a aspiração de medula óssea é um processo que causa dor e desconforto nos pacientes e por isso, buscou-se aprimorar a extração dessas células de outros tecidos.

Assim como a medula óssea, o tecido adiposo é derivado principalmente do mesoderme e apresenta um estroma que pode ser facilmente isolado (52). Ele é um dos tecidos humanos mais abundantes, constitui entre 15 % e 20 % do peso corporal dos homens e entre 20 % e 25 % do das mulheres e está amplamente distribuído pelas várias regiões do corpo (53). Logo, viu-se o tecido adiposo como uma fonte favorável à obtenção das células mesenquimais, dada sua fácil acessibilidade, uma vez que é possível extrair células mesenquimais do lipoaspirado de cirurgias plásticas estéticas que seria descartado (54, 55).

Estudos comparativos entre as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (ASC) e as MSCs demonstraram que essas são fenotípica e geneticamente similares e que, assim como as MSCs, as ASCs também apresentam capacidade de diferenciação nas múltiplas linhagens mesodermiais (52). Entretanto, apesar de similares, essas células não são idênticas e um

estudo comparativo utilizando o mesmo doador para a extração de ambas demonstrou que as ASC apresentam um perfil proliferativo maior, pois ao se comparar a quantidade de células necessárias para atingir 100 % de confluência em uma semana, foi necessário apenas 5 % do número de células usado para MSC, sugerindo o uso das ASC como fonte preferencial para aplicação clínica (56).

Nos últimos anos, diversos trabalhos utilizaram modelos animais para IAM, no intuito de demonstrar tanto a segurança quanto a eficiência da injeção das ASCs, em reparar o dano no miocárdio infartado (57-59). O que se observou nesses trabalhos foi que o transplante, quer seja de MSCs ou de ASCs, reduz o tamanho do infarto, melhora a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, reduz a apoptose das células e aumenta densidade vascular e a perfusão do miocárdio em comparação aos animais não tratados (60-68).

1.6.1 Efeitos parácrinos

Na tentativa de entender a contribuição das células-tronco mesenquimais ao reparo cardíaco, foram propostos diferentes mecanismos de ação. A primeira possibilidade de ação das ASCs no reparo ao dano seria que essas células se diferenciavam em cardiomiócitos (51, 69). Em 2005, Strem e colaboradores demonstraram pela primeira vez em camundongos que ASCs injetadas no coração com lesão apresentavam marcadores específicos de células cardíacas. Além disso, os animais tratados apresentavam uma melhora significativa na função cardíaca global e um aumento da densidade capilar na zona da lesão (70). Outro estudo utilizando o modelo experimental de IAM em porcas que recebiam injeções transendocárdicas de MSC alogênicas também demonstrou que essas células poderiam sobreviver e se fixar no coração, além de se diferenciarem em cardiomiócitos e células musculares lisas (71).

Entretanto, vários trabalhos falharam em discernir a capacidade de diferenciação das ASCs *in vivo* e demonstraram que apenas uma pequena quantidade de células mesenquimais transplantadas conseguia realizar o enxerto e sobreviver após quatro a cinco semanas da injeção (62, 72-74). Através de análises histológicas, um dos trabalhos demonstrou que apenas

2 % do total de células mesenquimais injetadas no coração de porcos permaneciam presentes após duas semanas de infusão (74). Também foi comprovado que as células remanescentes não apresentavam marcadores de diferenciação para cardiomiócitos, células endoteliais ou células musculares lisas (62). Todas essas observações não correspondem com a ideia de que as MSCs estariam se diferenciando em cardiomiócitos.

Uma vez sabendo que as MSC injetadas no coração não permaneciam enxertadas por mais que algumas semanas e que provavelmente essas células também não se diferenciavam em cardiomiócitos, alguns pesquisadores continuaram utilizando os modelos animais, na tentativa de entender quais seriam os mecanismos pelos quais as células-tronco mesenquimais estariam contribuindo para o reparo cardíaco. Dessa forma, foram realizados estudos comparativos de MSC com o meio condicionado dessas células, e foi observado que o meio condicionado era capaz de recapitular os efeitos benéficos observados quando se administrava as células (75-81). Por isso, foi sugerido que o mecanismo de ação pelo qual as MSCs confeririam proteção tecidual e melhora de algumas funções cardíacas em modelos animais e em pacientes pós-injeção das mesmas seria via efeito parácrino.

O primeiro grupo a avaliar o efeito parácrino das células mesenquimais foi do Gnecchi e colaboradores, demonstrando que especialmente em condições de hipóxia, MSC que expressavam altos níveis de Akt secretavam fatores que exerciam efeitos benéficos em cardiomiócitos isolados *in vitro*, e também demonstraram que a injeção intramiocárdica do meio de cultura condicionado pelas MSCs geneticamente modificadas reduzia o tamanho do infarto em roedores na mesma proporção, quando comparado à injeção de MSCs (78). Posteriormente, outro grupo também demonstrou que o meio condicionado de MSCs não modificadas era capaz de reduzir o tamanho do infarto. Nesse trabalho, Timmers e colaboradores observaram uma redução de aproximadamente 50 % do tamanho do infarto em modelos de isquemia miocárdica em porcos e camundongos (81). Dessa forma, foi demonstrado que o meio condicionado das MSCs era capaz de regular a remodelação ventricular, a inflamação, a apoptose, a regeneração de cardiomiócitos e a neovascularização em tecido cardíaco infartado.

Apesar de outros estudos confirmarem o efeito parácrino das MSCs e buscarem identificar quais componentes do meio condicionado dessas células seriam os responsáveis por esse efeito, nenhum dos fatores identificados como citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas quando administrados individualmente, nos diversos modelos animais, foram capazes de mimetizar o reparo tecidual observado pela injeção do meio condicionado. Além disso, a administração desses fatores apresentava algumas questões limitantes, como o direcionamento às células-alvo, além da manutenção da estabilidade e potencial biológico. Contudo, se esses fatores fossem transportados dentro de uma vesícula celular, eles estariam protegidos de degradação e poderiam ser entregues às células-alvo de maneira mais direcionada em função dos receptores de membrana (82). Lai e colaboradores avaliaram em modelo murino, o potencial efeito reparativo do meio de cultura condicionado de MSC na modulação do reparo cardíaco pós-infarto e sugeriram que a ação parácrina das MSCs era mediada por microvesículas, que caracterizaram como sendo os exossomos (83). Dessa forma, a ação parácrina das MSCs foi atribuída, pelo menos em parte, aos exossomos secretados por essas células.

Exossomos

A comunicação celular é um mecanismo essencial dos organismos multicelulares e até duas décadas atrás, acreditava-se que essa comunicação poderia ocorrer apenas de duas formas: através do contato célula-célula ou através de moléculas secretadas (84). A secreção de vesículas extracelulares foi inicialmente descrita como um meio de eliminar compostos desnecessários da célula (85). No entanto, hoje se sabe que as vesículas extracelulares são mais do que apenas portadores de resíduos e que podem ser consideradas um terceiro mecanismo envolvido na comunicação celular(86).

Vesícula extracelular é o termo genérico atualmente utilizado para se referir a todas as vesículas de membrana secretadas. Elas são partículas esféricas, revestidas por uma camada fosfolipídica, que apresentam em seu conteúdo o citosol das células que lhe deram origem e que são cuja liberação

ocorre tanto em células eucarióticas quanto procarióticas (84, 87). Por carregarem um grande número de moléculas em um volume pequeno, vesículas extracelulares podem ativar diversas vias de sinalização simultaneamente quando adentram a célula-alvo. Além disso, o transporte e entrega de várias moléculas protegidas por uma vesícula membranosa pode conferir proteção de degradação extracelular, assim como facilitar o reconhecimento das células-alvo através dos receptores de membrana (82). Muitos termos têm sido utilizados para descrever as vesículas extracelulares, incluindo micropartículas, vesículas derivadas da membrana plasmática, ectossomos, exovesículas, corpos apoptóticos, dentre outros (88). Contudo, com base no conhecimento atual de sua biogênese, as vesículas extracelulares podem ser amplamente divididas em duas categorias principais: exossomos e microvesículas (89).

O termo exossomos foi inicialmente utilizado para descrever pequenas vesículas que variavam de 40 a 1.000 nm. Contudo, a origem subcelular não estava clara (87). Por volta dos anos 80, um estudo isolou vesículas extracelulares de meio de cultura de reticulócitos de ovelhas e se observou que essas vesículas possuíam diversas características em comum com a membrana plasmática dos reticulócitos, inclusive a presença do receptor de transferrina (90). A nomenclatura foi então adaptada e o termo “exossomos” passou a denominar pequenas vesículas de origem endossomal, de tamanho entre 30 e 100 nm ou possivelmente um pouco maior (máximo 150 nm) e que são liberadas através da fusão do endossomo multivesicular ou corpos multivesiculares com a membrana plasmática (84, 87).

Os exossomos se originam através da internalização da membrana plasmática durante um processo chamado de endocitose, um processo dinâmico de reciclagem da membrana plasmática ou dos componentes celulares, onde ocorrerá a internalização de regiões específicas da membrana plasmática, bem como pequenas quantidades de fluido extracelular (87). O sistema endossomal consiste em vesículas endocíticas primárias, endossomos precoces, endossomos tardios (também chamados de corpos multivesiculares, MVBs) e lisossomos (91). Endossomos precoces amadurecem e formam endossomos tardios através de processos dependentes de interações com o complexo de Golgi. A internalização da membrana dos endossomos tardios dá

origem a vesículas intraluminais – os exossomos. Os MVBs podem se fundir à membrana plasmática para liberar os exossomos por exocitose ou podem ser enviados para degradação lisossômica (82, 91) (Figura. 1). Uma vez liberados, os exossomos podem ser encontrados na maioria dos fluidos biológicos, incluindo urina, fluido cefalorraquidiano, leite materno, fluido ascítico, sêmen, bile, líquido amniótico, em frações dos fluidos sanguíneos como soro e plasma e também no meio de cultura das células (84, 87).

Figura 1: Esquema representativo do processo de formação dos exossomos. Endossomos primários dão origem aos corpos multivesiculares, que darão origem aos exossomos.

O mecanismo de ação dos exossomos está relacionado com a comunicação celular, pois carregam e transferem diversas moléculas, desde citocinas, proteínas, lipídios, mRNA até microRNAs (miRNAs) para outras células. Como são formados a partir de um endossomo, praticamente todos os exossomos, independentemente do tipo celular, contém proteínas atuantes na via endocítica, tais como anexinas e Rab GTPases que são importantes para o transporte e fusão com a membrana, tetraspaninas incluindo CD63, CD81 e CD9 e proteínas como Alix e TSG101, que estão envolvidas na origem dos MVBs, além de integrinas e proteínas de choque térmico (82, 84, 88).

Uma das descobertas mais interessantes do conteúdo dos exossomos foi sua habilidade de carrear mRNA e miRNAs, que tornam as vesículas capazes de desempenhar papéis importantes na transferência de informações biológicas e na reprogramação das funções das células receptoras (88, 92). O recente entendimento de que os miRNAs estariam sendo exportados das células e poderiam regular a expressão gênica de diversos processos biológicos como crescimento celular, diferenciação, morte, angiogênese e imunomodulação em células distantes, gera uma janela de oportunidades para estudos na comunicação celular e para buscar entendimento do uso dos exossomos como agentes terapêuticos, assim como pode estimular os mecanismos endógenos de regeneração que representa uma estratégia terapêutica alternativa extremamente atrativa (93, 94).

miRNAs

Os miRNAs são RNAs não codificantes de fita simples, curtos com 19 a 22 nucleotídeos. Por muito tempo foram considerados como “lixo” até serem implicados na regulação da expressão gênica e, portanto, estão imensamente envolvidos em diversos processos biológicos como desenvolvimento celular, a proliferação e apoptose (95).

Os genes de miRNA são transcritos como precursores de miRNAs (pri-miRNAs) pela RNA polimerase II ou III e são submetidos à adição de *cap* e poliadenilados, formando estruturas que se dobram em grampos (96). Ainda no núcleo, sofrem o primeiro processamento, onde o pri-miRNA é clivado pelo complexo microprocessador nuclear formado pela enzima RNase III Drosha e seu cofator essencial, a proteína de ligação DGCR8 (proteína 8 da região crítica da síndrome de DiGeorge), também conhecida como Pasha em *D. melanogaster* e *C. elegans* (97). Esse processamento resulta no pre-miRNA, com cerca de 70 pares de base e apresenta uma estrutura de grampo com um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples (98).

O pre-miRNA é então transportado do núcleo para o citoplasma através da proteína exportina-5 (XPO-5), onde é novamente clivado (agora por Dicer,

uma endonuclease do tipo RNase III) gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos (99). Em princípio, o miRNA fita dupla poderia dar origem a dois miRNAs maduros diferentes. No entanto, apenas uma fita interage com as proteínas argonauta (AGO) para formar o complexo silenciador induzido por RNA (RISC), enquanto a outra fita é degradada (100). Uma vez formado, o RISC identifica seus mRNAs-alvo via busca de sequências nucleotídicas complementares. O pareamento dos miRNAs com seus mRNA-alvo regula a estabilidade e tradução, sendo várias situações possíveis, dependendo do nível de complementaridade entre as duas sequências. Se o pareamento entre miRNA e mRNA é extenso, ocorre a remoção enzimática da cauda poli (A) do mRNA, tornando-o susceptível à ação de exonucleases. Se o pareamento das duas sequências não é muito extenso, ocorre a repressão da tradução(101).

miRNAs e o infarto agudo do miocárdio

Foi demonstrada a presença de microRNAs em numerosos processos fisiopatológicos cardíacos, como diferenciação de células-tronco, proliferação e migração de células cardiovasculares, inflamação do miocárdio e apoptose, remodelamento cardíaco, contratilidade, metabolismo e arritmias, entre outros. Um estudo em camundongos e humanos demonstrou que em resposta ao infarto agudo do miocárdio há redução na expressão dos miRNAs da família miR-29 (miR-29a, miR -29b, miR-29c) na zona limítrofe da área infartada e em regiões remotas do miocárdio, enquanto que a expressão de miR-21, miR214 e miR-223 estava aumentada (102). A família miR-29 tem como alvo um grande número de genes relacionados à matriz extracelular, tais como *ELN*, *FBN1*, *COL1A1*, *COL1A2* e *COL3A1*, e foi demonstrado que o aumento da expressão de miR-29 em fibroblastos reduz a expressão de colágeno. Dessa forma, sua baixa expressão no infarto favorece o reparo cardíaco pós-infarto(103).

Como descrito nas seções anteriores, a morte de cardiomiócitos desempenha um papel crítico na patogênese do infarto do miocárdio. Vários mecanismos de regulação de apoptose são descritos para os miRNAs.

Membros da família miR-15, que compreende seis miRNAs intimamente relacionados, foram os primeiros a serem descritos como sendo aumentados após isquemia e capazes de induzir a morte celular de cardiomiócitos. O bloqueio dos miRNAs dessa família favoreceu a redução do tamanho do infarto após isquemia-reperfusão em camundongos e porcos (104). A atividade promotora de morte celular do miR-15 parece estar relacionada a sua capacidade de reduzir os níveis celulares de adenosina trifosfato (ATP) e reduzir a estabilidade mitocondrial via inibição do fator de ribosilação de ADP 2 (ARL2) (105). Outros miRNAs que regulam negativamente a sobrevivência celular são os miRNAs pertencentes à família miR-34, (miR-34a, miR-34b e miR-34c), cuja inibição da expressão *in vivo* usando antagomiRs melhorou a sobrevivência dos cardiomiócitos após IAM e, assim, preservou a função contrátil cardíaca (106). O miR-24, um membro do cluster miR-23/24/27, foi reportado como sendo um miRNA cardioprotetor *in vitro*, e seu aumento de expressão *in vivo* foi capaz de atenuar o tamanho do infarto e melhorar a função cardíaca após IAM (107).

Estudos prévios mostraram que a proliferação de cardiomiócitos também pode ser influenciada pelos miRNAs. Eulalio e colaboradores demonstraram que alguns miRNAs, incluindo o miR-199a podem estimular a entrada de cardiomiócitos no ciclo celular em roedores e induzir regeneração cardíaca após o infarto agudo em camundongos (108). A indução da expressão de miR-199 no coração infartado de porcos reduziu o tamanho do infarto, aumentou massa muscular e melhorou de forma global a contratilidade do coração (109).

Após o infarto agudo do miocárdio, a sobrevivência do maior número de cardiomiócitos possíveis é de extrema importância, uma vez que favorece a preservação do miocárdio, assim como as funções cardíacas, além de limitar o remodelamento cardíaco. Uma das maneiras de evitar o aumento de cardiomiócitos perdidos é a formação de novos vasos sanguíneos que garantam a vascularização do tecido cardíaco saudável (110). Vários miRNAs foram descritos por serem capazes de modular a angiogênese. A inibição do miR-92 e do miR-24 em camundongos aumentou a densidade capilar e promoveu melhora da função cardíaca após o infarto agudo do miocárdio (111,

112). Os membros da família miR-15 não só induziram morte celular de cardiomiócitos e reduziram a proliferação de cardiomiócitos, mas também inibiram a angiogênese (113).

Exossomos – Potenciais compostos terapêuticos

Evidências mostram que o transplante de células mesenquimais de tecido adiposo exercem cardioproteção pós-infarto do miocárdio, com redução do tamanho do infarto, melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, diminuição da apoptose dos cardiomiócitos, aumento da densidade vascular e redução da fibrose (62, 77, 78, 80, 81). Acredita-se que estes efeitos sejam mediados por moléculas secretadas pelas ASC, que atuam localmente, entretanto, os mecanismos por trás dessa ação parácrina ainda carecem de estudos. Exossomos são candidatos à mediação dessas respostas e estudar os exossomos e os potenciais miRNAs que estes transportam são de grande importância para validar seus possíveis efeitos cardioprotetores, assim como compreender melhor os mecanismos responsáveis por esses efeitos, como a comunicação célula-célula e órgão-órgão. Além de ajudar a entender o mecanismo das terapias celulares na doença isquêmica, este processo pode também fornecer grande oportunidade para o desenvolvimento de novas terapias, como o direcionamento de compostos terapêuticos que atuam nas células alvo.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Testar a hipótese que os exossomos de células-tronco mesenquimais estão associados ao efeito cardioprotetor induzido pelo transplante destas células pós-infarto do miocárdio.

Objetivos específicos:

Considerando o efeito pleiotrópico da resposta induzida pelo transplante celular pós-infarto,

- Identificar os processos do reparo cardíaco influenciados pela exposição aos exossomos nas respectivas células-alvo que compõe o tecido cardíaco;
- Identificar os efeitos da exposição aos exossomos nas células do sistema inflamatório;
- Identificar os miRNAs dos exossomos das rASCs, que potencialmente regulam as vias candidatas de reparação cardíaca;

3. Métodos

3.1 Extração, cultura e caracterização das células mesenquimais do tecido adiposo

3.1.1. Extração e cultura

Ratos wistar, com dez semanas de vida, mantidos no biotério do Instituto do Coração, à temperatura ambiente, com livre acesso a água e a comida e sob ciclo claro-escuro de 12 h foram utilizados para a obtenção de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (rASCs). Para isso, os animais foram devidamente anestesiados com dose ajustada de xilazina e ketamina (15 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente) e submetidos à remoção cirúrgica do tecido adiposo subcutâneo inguinal, que foi armazenado em tubo de 50 ml em solução de penicilina-estreptomicina a 1 % em PBS. Em capela de fluxo laminar, o tecido adiposo foi lavado com PBS para retirada de excesso de sangue, macerado e exposto à solução de digestão, composta de 20 mg de Colagenase tipo 1A (Sigma Aldrich) e 200 mg BSA (Sigma Aldrich) em 20 ml de DMEM com baixa glicose (LGCBio) sob agitação de 160 RPM a 37 °C por 40 min. Após esse período, a digestão foi interrompida com a adição de 10 ml de FBS (Gibco), seguida da centrifugação a 1500 RPM por 15 min em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 8 ml de meio de cultura (DMEM com baixa concentração de glicose, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 1 % Piruvato de Sódio e 10 % FBS) e plaqueado em placas de 100 mm³. Três horas após o plaqueamento, o sobrenadante foi transferido para outra placa do mesmo tamanho e foram adicionados 8 ml de meio de cultura à placa de origem. No dia seguinte, o meio de cultura foi novamente trocado para remoção de células não aderentes e as células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado em dias alternados, até que as culturas de rASCs atingissem uma confluência de 80 %, quando as ASC foram submetidas a uma solução de tripsina (Vitrocell) por 3 min a 37 °C, para que as células aderentes se

soltassem da placa. A ação da tripsina foi interrompida adicionando 2x o volume de tripsina de FBS. As células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 min e o sobrenadante foi removido. O *pellet* de células foi ressuspensionado em meio de cultivo para rASCs e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células foram distribuídas em novas placas/garrafas, à proporção de 10.000 células/cm² (passagem 1). Quando as células atingiram 80 % de confluência (7-10 dias de cultura), foram novamente tripisinizadas e plaqueadas em novas garrafas (passagem 2). Respeitou-se um limite de 3 passagens para cada linhagem.

3.1.2 Caracterização das culturas de rASCs por análise de marcadores de superfície

A caracterização dos marcadores de superfície das rASCs foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo. A uma suspensão de 1×10^5 células, obtidas após tripsinização de culturas de rASCs, foi adicionado anticorpo primário purificado (CD73 Ecto-51-nucleotidase – BD Bioscience) ou anticorpos conjugados aos fluorocromos FITC, PE e APC (CD29 integrina $\beta 1$, CD45 receptor tipo C, proteína tirosina fosfatase, também conhecido como antígeno expresso em leucócitos, CD31 molécula de adesão celular endotelial plaquetária, CD90 Thy-1 antígeno 1 de diferenciação de timócitos – BD, Bioscience) por 15 min ao abrigo da luz (114). As células incubadas com anticorpo primário purificado foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (Alexa fluor 647 1:1000 v/v Invitrogen, Life Technologies) por 15 min ao abrigo da luz. Após este período, 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo BD Accuri (Becton Dickson) e posteriormente analisados no *software* FCS Express 4 (De Novo Software).

3.2 Extração e caracterização dos exossomos derivados das células mesenquimais de tecido adiposo

3.2.1 Extração de exossomos de rASCs

A extração dos exossomos foi realizada utilizando o meio condicionado das rASCs na passagem 3. Para isso, as células mesenquimais foram cultivadas até atingirem cerca de 80% de confluência, quando o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com DPBS (Gibco), por duas vezes e submetidas à privação de soro (pois o soro é rico em exossomos) por 24 h, o qual foi denominado meio condicionado. Após este período, o meio condicionado foi filtrado a 0,22 µm, transferido para tubos de 50 ml e centrifugado a 2,000 x g a 4 °C por 30 min para retirada de debris. O sobrenadante foi transferido para tubos apropriados à ultracentrifugação e centrifugados a 100,00 x g a 4 °C por 60 min para a extração dos exossomos. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 ml de PBS para lavar e retirar agregados proteicos. Realizou-se mais uma ultracentrifugação a 100,000 x g a 4 °C por 60 min, no qual o sobrenadante foi novamente descartado (115). Ao final da extração, as amostras foram divididas para proteína, miRNA ou ressuspensionadas em 200 µl de PBS para os tratamentos posteriores. A quantificação proteica dos exossomos foi realizada utilizando o kit de BCA (Thermo Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. O método BCA consiste da conhecida redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteínas em meio alcalino. O ácido bicinconínico (BCA) reage com o cátion cuproso (Cu^{1+}) formando um produto de cor púrpura, solúvel em água que exibe uma forte absorvência linear a 562 nm com concentrações crescentes de proteína (116).

3.2.2 Caracterização dos exossomos de rASCs

3.2.2.1 Análise de marcadores de superfície

A análise dos marcadores de superfície dos exossomos foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo. Uma vez que os citômetros de fluxo convencionais não conseguem distinguir vesículas menores que 300 nm, foram utilizadas microesferas magnéticas acopladas a anticorpo biotinilado (60 min, à temperatura ambiente e sob agitação) para que fosse possível realizar a detecção dos marcadores de superfície dos exossomos. A quantidade de exossomos foi estimada através da dosagem proteica (Item 3.2.1) e para cada 25 µg de proteína total de exossomos, foram adicionados 20 µl de microesferas acopladas a anticorpo biotinilado, seguido da incubação por 24 h, a 4 °C sob agitação. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada e o complexo microesferas-exossomos foi lavado e marcado com anticorpos para CD81 (BD 559519) ou para o isotipo específico IgG₁(BD 553972) (117). Foram adquiridos um total de 10.000 eventos no citômetro de fluxo BD Accuri (Becton Dickson) e o *software* FCS Express 4 (De Novo Software) foi utilizado para as análises.

3.2.2.2 Análise de rastreamento de partículas

Para determinar o tamanho e a concentração de exossomos nas amostras, foi realizada a técnica de análise de rastreamento de partículas no equipamento Nanosight LM10 (Malvern Panalytical). A técnica consiste na caracterização de micropartículas com base em características como o movimento browniano e as propriedades de espalhamento de luz, sendo capaz de determinar a distribuição do tamanho e a concentração de partículas em suspensões (118). As amostras de exossomos foram diluídas 25 vezes em um volume final de 1 ml. Utilizando uma seringa de 1 ml, a amostra foi injetada lentamente na câmara de amostra e visualizada através do microscópio com objetiva de 20x. Uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio capturou 30 quadros por segundo, gerando um arquivo de vídeo das partículas em movimento browniano. Foram realizados três mini vídeos por amostra para serem processados pelo *software* do equipamento, o qual gerou arquivos contendo a distribuição do tamanho dos exossomos e sua concentração.

3.3 Extração de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais microvasculares cardíacas

A extração de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos neonatais segue o protocolo previamente descrito por Jensen e colaboradores (119). Para isso, ratos neonatos foram sacrificados por decapitação dentro do fluxo laminar e os corações foram transferidos para uma placa de Petri contendo tampão de extração (NaCl 0,1 M; KCl 5,4 mM; MgSO₄ 0,8 mM; D-glucose 0,1 %; ADS 1X). Os átrios e os vasos maiores foram descartados e os ventrículos foram mantidos em ADS 1X, triturados em pequenos pedaços e transferidos para um tubo de 50 ml contendo tampão de digestão (Colagenase tipo II [Worthington Biochemical Corporation] e pancreatina [Sigma Aldrich] 1:2 v/v em 90 ml de ADS 1x. Os tubos foram colocados no homogeneizador sob agitação de 150 RPM, a 37 °C por 15 min e após esse período, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 ml, inativado com 2 ml de meio de extração (*DMEM com baixa concentração de glicose* e meio 199 na proporção de 4:1, 5% de HRS, 2,5% de NBCS, 1 µg/ml de BrdU) e centrifugado a 1100 RPM, por 5 min, a TA. Esse processo de digestão e neutralização foi repetido seis vezes ou até os corações estarem completamente digeridos. O *pellet*, formado pela centrifugação de todos os sobrenadantes das digestões, foi ressuspensionado em 10 ml de meio de extração, transferido para uma garrafa T75 e mantido a 37 °C por 45 min (*pre-plating*). Após 45 min, o sobrenadante foi recolhido e foi adicionado meio de cultura próprio às células aderidas (fibroblastos cardíacos).

Para a obtenção dos cardiomiócitos e das células endoteliais microvasculares cardíacas, o sobrenadante proveniente do *pre-plating* foi centrifugado a 1100 RPM por 5 min. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 10 ml de meio de plaqueamento e as células foram contadas na câmara de Neubauer. Para obtenção dos cardiomiócitos as células foram plaqueadas em placas previamente tratadas com laminina (2 h, 37 °C) e mantidas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ a 37 °C, trocando-se o meio 48 h após o plaqueamento para realização dos experimentos. Já para a obtenção de

CEMC foi realizada uma seleção utilizando microesferas magnéticas para enriquecimento.

3.3.1 Purificação das células endoteliais da microvasculatura cardíaca (CEMC)

Após a contagem das células foi realizado um protocolo de enriquecimento utilizando microesferas magnéticas (kit de extração de células cardíacas neonatais – Miltenyi Biotec) para a obtenção das células endoteliais microvasculares cardíacas. Para isso, as células foram centrifugadas a 300 x *g* por 5 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi então ressuspensionado em 80 ul de tampão – PBS com 0.5 % BSA e 20 ul do reagente de depleção de células não endoteliais cardíacas, homogeneizado e incubado por 15 min na geladeira e ao abrigo da luz. Em seguida, ajustou-se o volume da solução para 500 ul utilizando o tampão. As colunas magnéticas foram colocadas no suporte de separação e a solução foi adicionada às colunas de depleção de células não endoteliais cardíacas. O filtrado foi recolhido e centrifugado a 300 x *g* por 10 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao *pellet* 80 ul do tampão e 20 ul do reagente de seleção de CEMC. Após homogeneização, a solução foi armazenada na geladeira por 15 min ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 2 ml de tampão e centrifugadas a 300 x *g* por 5 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 500 ul de tampão e a solução foi passada pela coluna de seleção positiva para CEMC. A coluna foi lavada 3 vezes com 500 ul de tampão e removida do separador magnético. Foi pipetado 1 ml de tampão na coluna e o filtrado recolhido e centrifugado a 300 x *g* por 5 min. O *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultivo de CEMC (DMEM com alta concentração de glicose, 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % piruvato de sódio, 10% FBS, 1% EGCS e 200 ul de heparina) e plaqueado em placas previamente tratadas com fibronectina (50 µg/ml) por pelo menos 2 h, e mantidas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ a 37 °C.

3.3.1.1 Caracterização das culturas de células endoteliais da microvasculatura cardíaca por análise de marcadores de superfície

A caracterização dos marcadores de superfície das CEMC foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo. As CEMC aderidas foi adicionado 5 µg/ml de Alexa Fluor 488 AcLDL (Life Technologies) e incubado por 2 horas. Após esse período as células foram tripsinizadas. A uma suspensão de 1×10^5 células, obtidas após tripsinização de culturas foi adicionado anticorpos conjugados aos fluorocromos, PE (CD31 molécula de adesão celular endotelial plaquetária e CD90 Thy-1 antígeno 1 de diferenciação de timócitos – BD, Bioscience) por 30 min ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas 1100 RPM, por 5 min, a TA e adquiridas (10.000 eventos) no citômetro de fluxo BD Accuri (Becton Dickson) e posteriormente analisados no *software* FCS Express 4 (De Novo Software).

3.4 Extração, cultivo e polarização de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos

Para a cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMØ) foram utilizados ratos adultos com aproximadamente 350 g. Os animais foram sacrificados por administração da combinação dos anestésicos xilazina e ketamina (15 mg/Kg e 60 mg/Kg, respectivamente) e para a extração da medula óssea foram retiradas as patas traseiras. Essas foram cuidadosamente limpas expondo os ossos do fêmur e da tíbia, que foram levados para o fluxo laminar. Já em ambiente estéril, os ossos foram perfurados em suas extremidades e com uma seringa injetou-se meio RPMI com 10 % de FBS, “lavando” o seu interior. Esse meio foi então transferido para um tubo e centrifugado a 1200 RPM por 5 min, a 4 °C. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 ml de tampão de lise de hemácias durante 1 min, no gelo. Adicionou-se mais 3 ml de meio RPMI com 10% de FBS e realizou-se uma nova centrifugação. Novamente, o

sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas, contadas e plaqueadas à confluência de $6,5 \times 10^5$ células/cm².

3.4.1 Diferenciação e Polarização da cultura de Macrófagos

A diferenciação dos macrófagos foi realizada durante nove dias. Nos sete primeiros dias de diferenciação, as células foram expostas ao meio de cultura suplementado com 30 ng/ml da proteína recombinante M-CSF (*Recombinant Rat Macrophage Colony Stimulation Factor*, Peprotech). O meio foi trocado pela primeira vez após 3 dias de plaqueamento e depois em dias alternados. No sétimo dia de cultivo, as células foram tratadas com 50 µg/ml de exossomos e em paralelo com IFN-γ recombinante (10 ng/ml, Peprotech) ou IL-4 recombinante (20 ng/ml, Peprotech) a fim de induzir os perfis de polarização clássica (M1) ou alternativa (M2), respectivamente. Após 48 h de tratamento, os meios de cultura (meio condicionado) foram coletados, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 1ml de Trizol (Thermo Fischer Scientific) para obtenção do RNA das amostras e posterior realização dos ensaios de PCR em tempo real.

3.5 Ensaio de Proliferação celular por *High Content Screening* (HCS)

Cardiomiócitos de ratos neonatais foram plaqueados à confluência de 1×10^5 células/cm² em placas de 96 poços para fluorescência (*96 Wells Greiner Microplate, Black, Clear Bottom*), previamente tratadas com laminina por 2h a 37 °C e mantidos por 48 h em cultura, tempo necessário para demonstrar a viabilidade da cultura pelo batimento espontâneo. Passadas as 48 h, o meio de cultivo foi trocado por um meio de cultivo sem FBS, por pelo menos uma hora. Após esse período, foi realizado o tratamento com veículo (PBS) ou exossomos (50 µg/ml); ou as células foram expostas aos meios condicionados M1 (sobrenadante dos macrófagos tratados com IFN-γ), M2 (sobrenadante dos macrófagos tratados com IL-4) e Mexo (sobrenadante dos macrófagos tratados com exossomos). As placas foram mantidas por 24 h em câmara de

hipóxia (1 % O₂) e então lavadas com PBS e fixadas com PFA 4 % para posterior marcação.

Já os fibroblastos foram mantidos em cultura até atingirem pelo menos 80% de confluência após a extração. Atingida a confluência, as células foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas à concentração de 1×10^5 células/cm², em placas de 96 poços para fluorescência (*96 Wells Greiner Microplate, Black, Clear Bottom*). As células foram privadas de soro por 16h e no dia seguinte foi realizado o tratamento com exossomos (50 µg/ml), e como controle utilizou-se o mesmo volume de PBS. As placas foram mantidas por 24 h em câmara de hipóxia (1 % O₂) e então foram lavadas com PBS e fixadas com PFA 4 % para posterior marcação.

O equipamento de HCS é um microscópio capaz de adquirir automaticamente imagens de culturas celulares previamente marcadas com anticorpo fluorescente, e realizar análises tanto qualitativas como quantitativas e foi utilizado na determinação da proliferação celular. As culturas de cardiomiócitos e fibroblastos previamente fixadas foram lavadas com PBS por 3 vezes e permeabilizadas com solução de Tween-20 a 0,05 % em PBS por 15 min, a 4 °C. Após esse período, as placas foram novamente lavadas com PBS 3 vezes e utilizou-se uma solução de BSA a 5 % em PBS por uma hora para bloqueio de reações inespecíficas. Depois disso, os anticorpos primários previamente diluídos em solução de BSA a 2 % em PBS foram adicionados (Ki67 – 1:300 v/v, ab16667, Abcam; Tropomiosina- 1:300 v/v, T-9283 Sigma Aldrich) e as células foram incubadas por 16 h a 4 °C. Passado o tempo de incubação, a placa foi novamente lavada com PBS por 3 vezes, e incubada com os anticorpos secundários conjugados previamente diluídos em PBS (Alexa flúor 488 – 1:500 v/v, A11001, Alexa flúor 555 -1:500 v/v, A21428, Invitrogen, Life Technologies) juntamente com o DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride – 1:500 v/v, D1306, Invitrogen, Life Technologies) durante 1h30 min no escuro e à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada com PBS por 3 vezes e foram adicionados 100 µl de PBS em cada poço. Para a aquisição das imagens foi utilizado o *Image X Press Micro High Content* (Molecular Devices). Foram feitas cinco imagens do poço, correspondendo a aproximadamente 300 células analisadas e os tratamentos

foram realizados em triplicata. O processamento das imagens foi realizado pelo software *Multiwave Cell Scoring Meta Express* e as análises foram realizadas pelo programa *Cell Scoring*. Os cardiomiócitos foram distinguidos de outras células presentes nas culturas primárias (por exemplo, fibroblastos e células endoteliais) pela sua positividade para a marcação com a tropomiosina sarcomérica e foram considerados cardiomiócitos em proliferação apenas aqueles com marcação positiva para Ki-67. A proteína Ki-67 é um marcador celular para proliferação, uma vez que está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas está ausente nas células em repouso (quiescentes) (G0) (120).

3.6 Ensaio de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

O Ciclo Celular foi analisado usando Iodeto de Propídio (IP; Sigma–Aldrich), que é um fluorocromo que se liga ao DNA, de maneira que a quantidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA de cada célula. Assim as células podem ser separadas pelas fases do ciclo, sendo a fase G0/G1 aquela que não apresenta o DNA replicado, a fase S sendo uma fase de conteúdo intermediário de DNA e a fase G2 a que apresenta o DNA totalmente replicado, ou seja, o dobro da quantidade de DNA da fase G0/G1. Para esse ensaio, as CEMC foram plaqueadas em placas de 12 poços à densidade de 2×10^4 células por poço e deixadas por 24 h em meio completo. Após as 24 h, o meio foi trocado por um meio sem FBS e incubado por 24 h para bloquear o ciclo celular. Passadas 24 h, um dos poços foi tripsinizado e chamado de D0, que foi usado como controle da parada do ciclo celular. Nos poços restantes, foram realizados os seguintes tratamentos: meio sem FBS + exossomos (50 µg/ml), meio sem FBS + PBS ou os meios condicionados de M1, M2 e Mexo por mais 24 h, e após esse período o poço foi tripsinizado. As células foram ressuspensas em PBS 1x e fixadas em etanol 70 % gelado por 16 h. Para marcação com IP, a suspensão de células fixadas foi centrifugada a 1500 RPM por 5 min e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com PBS 1x, ressuspensas em 250 µl de solução

IP (0,1 % de NP40, 0,2 mg/ml RNase, 0,2 mg/ml PI) e incubadas por 30 min a 4 °C. As células marcadas foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri (Becton Dickson) e os dados obtidos foram analisados no programa FCS Express 4 (De Novo Software). Para as análises, foram adquiridos 5000 eventos dentro do R2.

3.7 Ensaio de Formação de Tubo

A formação de estruturas semelhantes a capilares foi analisada utilizando Geltrex com baixa concentração de fator de crescimento (Life Technologies)(121). Foram adicionados 40 ul de Geltrex por poço a uma placa de 96 poços e essa incubada por 30 min a 37°C para polimerização. As células endoteliais microvasculares cardíacas foram plaqueadas em duplicata à densidade de 1×10^4 e realizado o tratamento com veículo (PBS), exossomos (50 µg/ml) e VEGF (50 µg/ml controle positivo) ou com os meios condicionados M1, M2 e Mexo. As placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ a 37 °C. Seis horas depois, estruturas semelhantes a capilares foram fotografadas com um microscópio invertido com objetiva de 4x e a quantidade de tubos formados foi analisada usando o software ImageJ e o *plugin Angiogenesis Analyze*.

3.8 Ensaio de expressão proteica por *High Content Screening* (HCS)

A α -actina de músculo liso (α -SMA) é um marcador de miofibroblastos transdiferenciados no miocárdio infartado e remodelado (29, 30). A avaliação da expressão proteica de α -SMA foi realizada através de ensaio de imunofluorescência e as imagens e análises foram realizadas pelo equipamento de HCS. Para isso, os fibroblastos adquiridos no *pre-plating* foram mantidos em cultura até atingirem pelo menos 80 % de confluência após a extração. Atingida a confluência, as células foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas à densidade de 1×10^5 células/cm² em placas de 96 poços para fluorescência (96 Wells Greiner Microplate, Black, Clear Bottom). Após 24 h do

plaqueamento, os fibroblastos foram colocados em meio de cultura sem FBS por 16 h. Para indução de diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, foi utilizado o Fator de Crescimento Transformante- β (122) (TGF- β ; 10 ng/ml) por 48 h, nas seguintes proporções: TGF- β (10 ng/ml) + PBS, TGF- β (10 ng/ml) + Exossomos (50 μ g/ml) e somente PBS. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado e ao final do dia, as células foram colocadas em meio sem soro por 16 h. Em seguida, as placas foram fixadas com PFA 4 % para posterior marcação. Foi utilizado o mesmo protocolo de marcação para a proliferação celular, observando que nesse experimento utilizou-se o anticorpo primário (α -SMA – 1:100, ab5694, Abcam). As imagens também foram obtidas utilizando o *Image X Press Micro High Content* (Molecular Devices). E o processamento das mesmas foi realizado pelo software *Multiwave Cell Scoring Meta Express* e as análises pelo programa *Cell Scoring* que quantificou a intensidade de marcação da proteína *alfa-actina* de musculo liso. Foram analisadas 200 células por poço em cada tratamento em triplicata.

3.9 Análise da Expressão Gênica

3.9.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada com auxílio do reagente TRizol (Thermo Fischer Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada extração de RNA das culturas de fibroblastos cardíacos, para avaliar os marcadores de diferenciação em miofibroblastos (Colágeno 1 e 3 e α -actina de musculo liso) e das culturas de macrófagos derivados da medula óssea, para confirmar a polarização para os perfis inflamatórios (Interleucina 1- β , fator de necrose tumoral- α , óxido nítrico sintase 2, arginase 1, fator de crescimento de transformação- β e quimiocina ligante 2).

Resumidamente, após descongelamento, a solução foi centrifugada por 10 min a 12.000 x g a 4 °C, e o sobrenadante foi recuperado em um tubo novo. Ao sobrenadante foram adicionados 200 μ l de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol, e em seguida a solução foi misturada vigorosamente por 15 segundos e

incubada por 2 a 3 min à temperatura ambiente. O tubo foi então centrifugado por 15 min a 12.000 x *g* a 4 °C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 500 ul de isopropanol 100 % para cada 1 ml de Trizol, e a mistura incubada por 10 min a temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 x *g* a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75 %, sendo centrifugado por 5 minutos a 7.500 x *g* a 4 °C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi reconstituído em 100 ul de água livre de RNase. Os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro (ND-100 *Spectrophotometer* - NanoDrop Technologies, Inc.). A avaliação da qualidade do RNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3.9.2 Síntese de DNA complementar

Para realização da conversão do RNA em cDNA utilizamos o kit *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após o tratamento com DNase e sua inativação foi adicionado à reação 1 ul de *OligodT* (500 ug/ml, *IDT*) e 1 ul de *dNTP Mix* (10 mM cada), a um volume final de 12 ul seguido de incubação por 5 min a 65 °C. Posteriormente, adicionou-se a reação 4 ul de Tampão 5X *First-Strand*, 2 ul de DTT 0,1 mM, 1 ul *RNASEout* (40 U/ul) e 1 ul *SuperScript II*. A síntese de cDNA procedeu incubando a reação a 42 °C por 50 min, com posterior inativação da enzima, mantendo-a durante 15 min a 70 °C. As incubações foram realizadas no termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad).

3.9.3 Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os cDNAs obtidos previamente foram diluídos para concentrações de 10 ng/ul e utilizados para amplificação por PCR utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems). As reações de PCRs foram realizadas utilizando 10 ng de cDNA, 2,5 ul de mix dos primers (senso e anti-senso a 2,0 uM de cada; ver tabela 1) e 5,0 ul de Power SYBR Green PCR Master Mix®

(Applied Biosystems). As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento QuantStudio™ 12k Flex Real-Time PCR System (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate). Todas as reações foram submetidas a uma incubação inicial de 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos para amplificação. As ciclagens foram realizadas em dois passos (desnaturação de 95 °C por 30 s, seguida de anelamento com temperatura maior ou igual que 60 °C por 60 s). A análise do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo e o software quantificou a intensidade de fluorescência dada pelo SYBER e normalizou pelos dados de fluorescência obtidos pelo ROX. No início da amplificação, foi detectada a linha de base, pela fluorescência inicial, e o aumento acima dessa linha indicou a detecção dos produtos de amplificação gerados. O ΔRn consistiu do sinal de fluorescência do produto pelo sinal de fluorescência da linha de base. O parâmetro Ct foi definido como sendo o número de ciclos cuja fluorescência (ΔRn) cruzava essa linha (Threshold cycle). As reações de RT-qPCRs foram normalizadas em relação aos níveis de transcritos de GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). As alterações nos níveis de mRNA foram calculadas pelo método de análise de Livak e Schmittgen delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (123). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR

Gene	Primer Senso (5'-3')	Primer Anti-senso (3'-5')
<i>Col1a1</i>	CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT	TCCACGTCTCACCATTAGGG
<i>Col3a1</i>	AGCTTTGTGCAATGTGGGAC	ATCACAGAGGACAGATCCCG
<i>Acta2</i>	TGGAAAAGATCTGGCACCAC	CTCCGTTAGCAAGGTCGGA
<i>IFNγ</i>	CATGAGCATCGCCAAGTTCG	GAATCAGCACCGACTCCTTTT
<i>TNF-α</i>	ATCGGTCCCAACAAGGAGG	GATAAGGTACAGCCCATCTGC
<i>IL1-β</i>	CCTGTGTGATGAAAGACGGC	TATGTCCCGACCATTGCTGT
<i>Arg1</i>	TCCAAGCCAAAGCCCATAGA	AGCTTTCCTTAATGCTGCGG
<i>IL10</i>	TGGGAGAGAAGCTGAAGACC	AGATGCCGGGTGGTTCAAT
<i>CCL2</i>	CACAGCTGCTGCTTTCACC	GATGGGCTTCAGCACAGACT

3.10 Secreção de citocinas por membrana array

Para avaliar a expressão relativa (semi-quantitativa) das citocinas e quimiocinas secretadas por macrófagos M1, M2, Mexo e pelos próprios exossomos foi realizado um *array* de 29 citocinas e quimiocinas nas amostras utilizando o kit Rat Cytokine Array (#ARY008, R&D Systems). O ensaio se baseia na utilização de membranas de nitrocelulose previamente tratadas com anticorpos de captura (em duplicata) de 29 citocinas e quimiocinas. O sobrenadante da cultura de células ou o lisado celular são diluídos e misturados a anticorpos de detecção biotinilados. O complexo citocina-anticorpo de detecção liga-se ao anticorpo de captura imobilizado na membrana. A estreptavidina-peroxidase e os reagentes de detecção quimioluminescente são adicionados, e um sinal é produzido proporcionalmente à quantidade de citocinas ligadas. A quimioluminescência é detectada da mesma maneira que um Western blot. O experimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram bloqueadas em solução específica do kit, por uma hora a temperatura ambiente. Durante esse período, as amostras foram preparadas adicionando 1 ml meio condicionado (n=3) ou 200 µg de proteína dos exossomos, 0,5 ml de tampão e um coquetel de anticorpos primários. Depois de uma hora de incubação a TA, as amostras foram colocadas em contato com as membranas e incubadas até o dia seguinte a 4 °C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com avidina-HRP (1:2000) por 30 minutos, a TA em seguida foram novamente lavadas e incubadas com solução de quimioluminescência por um minuto e então reveladas.

As análises foram realizadas no software ImageQuant TL (GE Healthcare Life Sciences), pelo programa *Array Analysis*. Foi criada uma máscara comum a todas as membranas, com adequação das dimensões dos *spots* de cada amostra, a fim de evitar superestimar os valores obtidos. Em seguida, os valores de fundo foram considerados e os volumes finais das aquisições foram normalizados pelos controles positivos. A tabela final gerada foi analisada e os valores considerados foram em relação à alteração em

relação ao basal (controle positivo). Foi utilizada a unidade arbitrária porcentagem de intensidade (volume) para construção gráfica.

3.11 Análise de expressão dos miRNAs

3.11.1 Purificação dos miRNAs

A purificação dos miRNAs foi realizada utilizando o *miRNeasy Kit* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração dos exossomos, as amostras foram lisadas com 1 ml de QIAzol e mantidas à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 s, mantidas à temperatura ambiente por 3 min e centrifugadas a 4 °C, 12.000 g por 15 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual se adicionou 900 µl de etanol 100 %, seguido de homogeneização das amostras. A solução final foi dividida em duas partes para a purificação em coluna, onde 700 µl por vez foram centrifugados 8.000 x g por 15 s, seguido do descarte do eluído, acréscimo do tampão RWT à coluna e mais uma centrifugação a 8.000 x g por 15 s, com descarte do eluído. Estes ciclos de centrifugação foram então repetidos na presença do tampão RPE (500 µl). Em seguida, foram adicionados 500 µl de etanol 80 % a coluna e essa foi centrifugada a 8.000 x g por 2 minutos. A fim de eliminar todo líquido remanescente, a coluna foi novamente centrifugada com a tampa aberta por 5 min a 12.000 x g. Para eluir o miRNA, a coluna foi então transferida para um novo tubo e foram adicionados 14 µl de água livre de RNase, e centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto. Os miRNAs obtidos foram quantificados no fluorímetro Qubit (Thermo Scientific, EUA).

3.11.2 Chiparray

A análise de expressão global de miRNAs dos exossomos foi realizada utilizando a placa *array GeneChip™ miRNA 4.1* (Life Technologies), capaz de

identificar 728 miRNAs maduros de rato. Para esses ensaios foram utilizadas cinco amostras de exossomos extraídos de diferentes ASC. Após previa extração e quantificação dos miRNAs dos exossomos foram utilizados 130 nanogramas (130ng) de miRNA para o ensaio de *Chiparray* conforme protocolo do fabricante. Resumidamente, ao miRNA foram adicionados 2 µl de Poly-A controle (amostras de RNA exógeno de procarioto que irão auxiliar no monitoramento de todo o experimento) e solução para que a reação aconteça, em um volume final de 15 µl que foi incubado a 37 °C por 15 min. Após a ligação da cauda Poly-A ao miRNA, foi realizada a ligação da Biotina HSR ao complexo. Para isso, a amostra foi centrifugada e adicionado 4 µl de solução com biotina HSR, 2 µl da enzima *T4 DNA ligase* e a reação foi incubada a 25 °C por 30 min. Ao final da incubação foi adicionada a reação um *mix* de hibridização contendo um controle de hibridização eucariótico (hibridiza em locais pré-determinados no *chip* - utilizados como controle do *array*), sendo a reação novamente incubada a 99 °C por 5 min seguido de uma incubação de 45 °C por 5 min. Feito isso, 120 µl das amostras denaturadas foram para a placa de hibridização e posteriormente colocadas no equipamento *GeneTitan Multi-Channel* (MC) juntamente com o *array GeneChip™ miRNA 4.1*. No equipamento a placa de hibridização se acopla ao *array* e passa por uma incubação de 17 horas em um forno de hibridização, após isso elas são lavadas e coradas com diversos fluoróforos e então escaneadas para aquisição dos sinais. Os resultados foram analisados no software *Transcriptome Analysis Console* (TAC).

3.12 Modelo Animal de Infarto do miocárdio

Os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes institucionais de cuidado e uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (SDC/InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (4423/16/089). Foi utilizado o modelo de infarto agudo do miocárdio de artéria fechada em ratas adultas. Ratas wistar com 10 semanas de idade foram mantidas em caixas (5 animais/

caixa) com livre acesso à água e comida sob ciclo claro-escuro de doze horas. Para realização do procedimento, os animais foram anestesiados com uma combinação de ketamina (60mg/kg peso corpóreo) e xilazina (15 mg/kg peso corpóreo), entubados através de colocação de cateter intra-traqueal para ventilação a 2,5 ml 65 pulsos/min, com ciclos de pressão controlados em equipamento de ventilação para roedores. A temperatura corporal foi mantida a 37 °C durante todo o procedimento cirúrgico. Uma toracotomia lateral foi realizada e o coração foi exposto pelo lado esquerdo. A artéria coronária esquerda foi circundada por um fio de sutura de nylon (5,0) a aproximadamente 1 mm da sua origem, gentilmente ocluída, através da amarradura do fio. Este procedimento produziu uma área claramente demarcada (cianótica e protuberante) de isquemia aguda correspondente à distribuição da artéria coronária esquerda distal à oclusão. Os animais foram deixados em observação e 20 min após a oclusão, ainda sob anestesia, realizou-se a injeção dos tratamentos, usando uma seringa de insulina com agulha de calibre 30 incorporada, por via intramiocárdica (com agulha posicionada no miocárdio do animal, injetando-se na área limítrofe entre o miocárdio sadio e o isquêmico, conhecida com zona de borda). Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: (1) *sham*: animais apenas infartados; (2) AMI + PBS; (3) AMI + Exo (100 µg).

3.13 Avaliação da função cardíaca – exame de Ecocardiografia

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos ao exame de ecocardiografia 48h após a injeção dos tratamentos ou da realização do infarto no caso dos *shams* e 30 dias após a oclusão da artéria coronária. Para a aquisição das imagens, foi utilizado o equipamento VEVO 2100 – VisualSonics Vevo® 2100 Imaging System, Canadá. A análise de 48 h foi realizada como triagem e só foram considerados para o estudo os animais que apresentavam uma porcentagem de 30-40% de área infartada. Esse pré-requisito foi adotado com o propósito de evitar vieses na avaliação do desempenho cardíaco. Na análise de 30 dias foram realizadas medidas com

objetivo de determinar a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE), fração de encurtamento. Para a análise de imagens foi utilizado o software VevoCQ™ LV Analysis - VisualSonics, Canadá.

3.14 Análises histológicas

As análises histológicas foram realizadas após 4 semanas da injeção dos tratamentos. Os animais foram sacrificados por administração da combinação dos anestésicos Xilazina/ketamina (15mg/kg e 60mg/kg respectivamente). Os corações foram rapidamente coletados, lavados brevemente em PBS, pesados, fixados em formol a 10% em temperatura ambiente, embebidos em parafina, seccionados (6 mm) e posteriormente processados para os parâmetros histológicos.

3.14.1 Método de polarização por coloração de Picrosírius-Red (PR)

A coloração de PR permitiu uma análise quantitativa das fibras colágenas do tecido, através da distinta interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados e de parâmetros morfométricos tais como: (i) espessura, (ii) perímetro da parede ventricular esquerda, (iii) espessura média do septo interventricular e (iv) a porcentagem de sua área ocupada por colágeno intersticial. Este procedimento foi realizado em amostras obtidas de segmentos transversais médios e apicais do coração. Depois de fixados, os cortes histológicos foram submetidos à solução de 0,1 % de solução de *Sirius-Red* em ácido pícrico saturado, por 30 min. Depois, foram lavados em água corrente e os núcleos celulares foram contra corados com Hematoxilina, por um minuto. As lâminas histológicas foram preparadas com meio de montagem e lamínula para posterior análise no microscópio de luz.

3.14.2 Ensaio de imunohistoquímica

Para avaliar a infiltração de macrófagos no tecido cardíaco foi realizado o ensaio de imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-CD68, marcador amplamente utilizado na detecção de infiltrado inflamatório na literatura. Os cortes foram hidratados (solução de xilol e álcool) e lavados 3x em água corrente e, submetidos à recuperação antigênica (1:10, Antigen Retrieval Buffer 1, PMB1-250, Spring Bioscience) em panela de pressão, por 15 min, até atingir 95 °C e por mais 15 min até atingir 36 °C. As lâminas foram resfriadas por 20 min e então foram bloqueadas em solução de PBS BSA 2 % por uma hora, a TA. O anticorpo primário foi diluído em PBS na concentração desejada (CD68 – 1:100, ab31630, Abcam), e os cortes foram incubados *overnight* a 4 °C, em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio. Para detecção da reação de imunohistoquímica, utilizamos Histofine® (uma gota por corte, Simple Stain MAX PO, Nichirei Biosciences Inc.) por 30 min a TA. A revelação da peroxidase foi realizada através de 3'3Diaminobenzidine (DAB, DAB-125, Spring Bioscience) por 1 min, ao abrigo de luz. Os núcleos foram contra corados com Hematoxilina (por um minuto) e os cortes foram desidratados e montados, para análise no microscópio de luz.

3.14.3 Ensaio de TUNEL

Para avaliar a apoptose celular no tecido cardíaco infartado, foi realizado o ensaio de TUNEL. A apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA celular. Através da marcação desse DNA fragmentando com um nucleotídeo biotinilado (dUTP) pela enzima desoxinuceotidil transferase (rTdT) e posterior revelação é possível identificar os núcleos apoptóticos corados em marrom escuro e visualizar com um microscópio de luz. O método foi realizado de acordo com as informações do fabricante (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System Promega). Brevemente, os cortes foram hidratados (solução de xilol e álcool) e lavados 3x com solução de cloreto de sódio 0.85 % por 5 min e depois

lavados com PBS por mais 5 min e fixados com 4 % de paraformaldeído por 15 min a TA. As lâminas foram lavadas 2x com PBS por 5 min e adicionado a Proteinase K por 30 min a TA. Depois de lavados os cortes foram novamente fixados em 4 % de paraformaldeído por 5 min. Uma lâmina de controle positivo foi preparada, a qual foi adicionado DNase I para causar fragmentação do DNA. A solução contendo a enzima desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT), que se liga ao DNA fragmentado, foi preparada e adicionada aos cortes por 60 min a 37 °C em câmara úmida. Após lavagem das lâminas com PBS por 5 min, a peroxidase endógena foi bloqueada. Para detecção da reação foi utilizado estreptavidina HRP (1:500) por 30 min a TA. A revelação foi realizada através de 3', 3-Diaminobenzidina (DAB) por 1 min, ao abrigo de luz. Os núcleos foram contra corados com Hematoxilina (por um minuto) e os cortes montados em solução aquosa para análise no microscópio de luz.

3.14.4 Análise e quantificação das imagens

As imagens obtidas através do microscópio de luz foram analisadas pelo software LeicaQwin (LeicaQwin Image Analysis Software). Considerando que a área das imagens analisadas no software não varia, foi feita uma relação entre a quantidade de células positivas pela área tecidual total, a fim de evitar que os dados estivessem superestimados. Todas as medidas foram realizadas por dois pesquisadores independentes cegos para os tratamentos experimentais.

3.15 Análises estatísticas

As análises estatísticas e as representações gráficas foram realizadas com auxílio do *software GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc., USA). Para as análises entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Já para as análises com mais de dois grupos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via e teste Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os experimentos cujo valor de p foi menor que 0,05 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). A dispersão dos dados em relação à média foi representada graficamente na forma de $\pm$ desvio padrão da media (DP).

4. Resultados

4.1 Caracterização das culturas de rASCs por análise de marcadores de superfície

Células mesenquimais de tecido adiposo (rASCs) extraídas foram caracterizadas quanto ao seu perfil imunofenotípico via citometria de fluxo, com base nos critérios estabelecidos pela sociedade internacional de terapia celular (114). No histograma da figura 2, a população de rASCs é representada pela linha preta, enquanto que o isotipo é representado pela linha cinza. Verificou-se que estas apresentavam marcação positiva para CD73, CD90 e CD29, marcadores característicos de células mesenquimais. Já os marcadores CD45 e CD31 (que caracterizam progenitores hematopoiéticos e células endoteliais, respectivamente) não foram observados, o que nos permite afirmar que as células extraídas do tecido adiposo são, de fato, células mesenquimais, e que a cultura de rASCs é homogênea.

Figura 2: Perfil imunofenotípico das rASCs. Os histogramas mostram a expressão dos marcadores celulares positivos CD73, CD90 e CD29 e ausência de marcação para CD45 e CD31. A linha preta representa as populações de rASCs e em cinza o isotipo correspondente.

4.2 Caracterização dos exossomos de rASCs

4.2.1 Análise de Marcadores de Superfície

Exossomos derivados de rASCs foram também caracterizados com base no seu perfil imunofenotípico utilizando a citometria de fluxo acoplada a microesferas magnéticas. Conforme observado no histograma da figura 3, a maior parte da população de exossomos avaliada expressava o marcador de superfície característico CD81 (Tetraspanina 28).

Figura 3: Identificação dos marcadores típicos de exossomos. A expressão de CD81 pode ser observada no histograma. A população de exossomos está representada pela linha preta, enquanto o isotipo específico está em cinza.

4.2.2 Análise de rastreamento de partículas

Com o objetivo de determinar o tamanho e a concentração dos exossomos, foi realizada a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). A concentração e tamanho das vesículas extracelulares são calculados com base no espalhamento do feixe de luz que cada partícula gera e no movimento browniano dessas (Fig.4). Observamos que as amostras de exossomos derivados de rASCs apresentaram uma concentração média de $6,3 \times 10^9 \pm 2,9 \times 10^8$ partículas/ml e uma moda de tamanho $116,8 \text{ nm} \pm 12$ (Tabela 2).

Figura 4: Imagem representativa dos exossomos em movimento browniano.

Tabela 2: Tamanho e concentração dos exossomos derivados de rASCs

rASCs	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/ml)
A	$119,6 \pm 12$	$7,6 \times 10^9 \pm 4,8 \times 10^8$
B	$114,0 \pm 14$	$5,0 \times 10^9 \pm 1,05 \times 10^8$
C	$133,0 \pm 10$	$1,0 \times 10^{10} \pm 2,01^{09}$
D	$120,0 \pm 12$	$2,1 \times 10^{10} \pm 3,5 \times 10^9$
E	$110,0 \pm 13$	$1,2 \times 10^{10} \pm 2,5 \times 10^9$

4.3 Efeito dos exossomos derivados de rASCs nas células cardíacas

4.3.1 Exossomos aumentam a taxa de proliferação de cardiomiócitos submetidos à hipóxia

A fim de determinar se exossomos derivados de rASCs poderiam influenciar o perfil de proliferação dos cardiomiócitos neonatais, estes foram tratados com exossomos (50 µg/ml) ou com PBS (controle) por 24h e submetidos à hipóxia (1% de O₂) ou normóxia. A análise da taxa de proliferação celular (via marcação de ki67 em células tropomiosina cardíaca-positivas) (Fig. 5A e B) demonstrou que na condição de hipóxia e em resposta ao tratamento com exossomos há um aumento na taxa de proliferação (PBS

44,2 ± 12,41% versus exossomos 55,6 ± 9,54%) (Fig. 5C). Entretanto, não foram observadas alterações na taxa de proliferação celular dos cardiomiócitos na condição de normóxia (Fig. 5D). De maneira interessante, esses dados sugerem que os exossomos são capazes de aumentar a taxa de proliferação celular dos cardiomiócitos quando submetidos a estresse, o mesmo não foi observado na normóxia, quando comparados ao tratamento controle.

Figura 5: Exossomos derivados de ASC estimulam o aumento na taxa de proliferação dos CM quando submetidos às 24h de hipóxia. Imagens representativas (A) do grupo controle e (B) tratados com exossomos. Os cardiomiócitos foram marcados com tropomiosina sarcomérica (verde), Ki67 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As barras indicam (média ± DP) elevação da taxa de proliferação dos cardiomiócitos em hipóxia (C) e em normóxia (D) tratados com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS). **p<0,01.

4.3.2 Tratamento com exossomos induz angiogênese nas células endoteliais microvasculares cardíacas (CEMC)

4.3.2.1 Caracterização das células endoteliais microvasculares cardíacas

A fim de avaliar o potencial pró-angiogênico dos exossomos foi implementado o método de extração de células endoteliais microvasculares cardíacas (CEMC) da mesma extração de cardiomiócitos de ratos neonatos. A cultura apresentou morfologia característica de células endoteliais, com aspecto achatado e crescimento em monocamada (Fig. 6A). A análise por citometria de fluxo da marcação para CD31 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária) mostrou que 99,4% da população celular exibia este marcador (Fig. 6B) e ausência de marcação para CD90 (Thy-1, marcador de fibroblasto) (Fig. 6C). Funcionalmente, verificamos que 98,3% das células foram capazes de realizar a captação de LDL acetilado (Fig. 6D) e em conjunto, estes dados nos permitem afirmar que o método de extração de células endoteliais microvasculares cardíacas é eficaz e que a cultura é homogênea.

Figura 6: Caracterização das células endoteliais microvasculares cardíacas. Morfologia da cultura de células endoteliais microvasculares cardíacas (A). Expressão dos marcadores de superfície analisados por citometria de fluxo (B-D). A população de CEMC está representada pela linha preta e em cinza o isótipo correspondente.

4.3.2.2 Exossomos induzem a proliferação de células endoteliais da microvasculatura cardíaca

O próximo passo foi avaliar o efeito do tratamento com exossomos na proliferação das células endoteliais microvasculares cardíacas. Para isso, realizamos uma análise de ciclo celular por citometria de fluxo e os resultados demonstraram que o tratamento com exossomos aumenta a população de células em G2 para $16,4 \pm 2,46\%$ (Fig. 7Ab), quando comparado com o controle $10,4 \pm 0,56\%$ (Fig.7Aa), indicando que o tratamento com exossomos induziu as células endoteliais a entrarem em mitose (Fig.7B e C).

Figura 7: Efeito do tratamento com exossomos nas células endoteliais microvasculares cardíacas. (A) Imagens representativas das fases do ciclo celular, G0-G1 em vermelho, S em verde e G2 em azul. (a) grupo controle e (b) tratados com exossomos. (B e C). As barras indicam (média $\pm$ DP) aumento da indução de proliferação nas CEMC tratadas com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS). * $p < 0,05$.

4.3.2.3 Exossomos promovem a formação de estruturas tubulares em células endoteliais da microvasculatura cardíaca

Uma vez observado que os exossomos eram capazes de aumentar a taxa de proliferação celular das CEMC, a próxima etapa foi investigar se os exossomos também seriam capazes de induzir a formação de estruturas tubulares semelhantes a capilar, uma característica funcional de células endoteliais. A figura 8 (A-C) mostra que as CMEC aderiram à matriz de colágeno. No entanto, apenas as CMEC que foram submetidas ao tratamento com os exossomos (Fig. 8B), assim como o controle positivo VEGF (Fig. 8C), foram capazes de induzir a formação de estruturas tubulares. A quantificação das estruturas tubulares está representada na figura 8D. Esses resultados sugerem que de forma similar ao VEGF, o tratamento com exossomos é capaz de induzir células endoteliais a formarem estruturas tubulares em cultura.

Figura 8: Exossomos derivados de ASC induzem a formação de estruturas semelhantes a capilares *in vitro*. Imagens representativas (A) do grupo controle e (B) tratados com exossomos (C) tratados com VEGF. Após 8h de plaqueamento das células endoteliais da microvasculatura cardíaca, é possível observar a formação de tubos. As barras indicam (média $\pm$ DP) aumento do número de tubos formados nas CEMC tratados com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS) (D). ** $p < 0,01$.

4.3.3 Exossomos derivados de mesenquimais de tecido adiposo reduzem a proliferação de fibroblastos cardíacos

Com o propósito de avaliar se os exossomos poderiam reduzir a proliferação dos fibroblastos cardíacos, as culturas dessas células foram tratadas com veículo (PBS) ou exossomos (50 $\mu\text{g/ml}$) e submetidas à hipóxia (1 % de O_2) ou normóxia por 24 h e as células em proliferação foram marcadas e analisadas via imunofluorescência para ki67 (Fig. 9A-B). Verificamos que os fibroblastos em hipóxia submetidos tratados com PBS apresentaram uma taxa de proliferação celular de $34.6 \pm 8.9 \%$, enquanto que o tratamento com exossomos resultou em redução na taxa de proliferação celular para $25,3 \pm 6,2 \%$ (Fig. 9C). Em condições basais, também observamos redução na taxa de proliferação celular de $43,1 \pm 7,2 \%$ (PBS) para $37,1 \pm 9,2 \%$ quando tratados com exossomos (Fig. 9D), demonstrando papel regulatório dos exossomos também na proliferação dos fibroblastos cardíacos.

Figura 9: Exossomos derivados de ASC reduzem a taxa de proliferação dos fibroblastos quando submetidos à hipóxia por 24h. Imagens representativas (A) grupo controle e (B) tratados com exossomos. A cultura de fibroblastos foi marcada com Ki67 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As barras indicam (média $\pm$ DP) da redução da taxa de proliferação

dos fibroblastos cardíacos tratados com exossomos em comparação ao controle (tratado com PBS) (C). **** $p < 0,0001$.

4.3.4 Exossomos inibem a transdiferenciação de fibroblastos TGF- β induzidos em miofibroblastos

Visto que exossomos exercem papel na proliferação de fibroblastos, buscamos avaliar qual seria o efeito do tratamento com exossomos na transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos utilizamos o modelo de indução com TGF- β .

Através da análise quantitativa da expressão gênica avaliada por PCR em tempo real, constatamos que o tratamento com exossomos resultou em redução significativa tanto na expressão de α -SMA (Fig. 10A), quanto na expressão dos colágenos do tipo I (Fig. 10B) e do tipo III (Fig. 10C), revertendo esses aos níveis do grupo controle.

Figura 10: Exossomos derivados de ASC inibem a transdiferenciação de fibroblastos, induzidos por TGF- β , em miofibroblastos. A expressão dos níveis de mRNA (A) α -SMA, (B) Colágeno I e (C) Colágeno III foi determinada pelo ensaio de RT-qPCR. As barras indicam (média $\pm$ DP). ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação aos fibroblastos transdiferenciados por TGF- β .

Uma vez que os níveis de mRNA de α -SMA estavam reduzidos no tratamento com exossomos, uma marcação de α -SMA por imunofluorescência foi realizada para avaliar se o efeito dos exossomos se refletia também em nível proteico e verificamos que os efeitos observados em nível gênico se repetem (Fig.11 A-D), já que as células tratadas concomitantemente com os exossomos apresentavam intensidade α -SMA menor do que o controle (Fig. 11E).

Figura 11: Exossomos inibem a expressão de α -SMA de fibroblasto induzidos a transdiferenciação em miofibroblastos. Imagens representativas (A e B) do grupo tratado com TGF- β (C e D) tratados com TGF- β e exossomos. Os fibroblastos diferenciados com TGF- β foram marcados com α -SMA (verde) e os núcleos com DAPI (azul). (E) Intensidade de expressão α -SMA foi avaliada por imunofluorescência. As barras indicam (média $\pm$ DP). # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle * $p < 0,05$ em relação aos fibroblastos transdiferenciados com TGF- β .

4.3.5 Exossomos induzem diferenciação em macrófagos derivados de medula óssea

Visando o importante papel dos macrófagos pós-lesão miocárdica(18, 124), nos questionamos se os exossomos seriam capazes de modular a resposta inflamatória pós-lesão, atuando na polarização dos macrófagos teciduais. Com base nos controles de polarização com IFN- γ (Fig. 12A) e IL-4 (Fig. 12B) foi possível observar que o tratamento com exossomos é capaz de alterar a morfologia dos macrófagos derivados de medula se assemelhando aos macrófagos polarizados (Fig. 12C).

Figura 12: Cultura de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos, cultivados por sete dias com a citocina M-CSF. (A) controle pró-inflamatório cultivado com IFN- γ (B) controle anti-inflamatório cultivado com IL-4 e (C) macrófagos cultivados com 50ug/ml de exossomos, respectivamente (10x).

4.3.5.1 Análise do perfil fenotípico

Vista a capacidade dos exossomos de diferenciar os macrófagos, realizamos uma caracterização fenotípica com base na expressão gênica típica das polarizações clássica – M1 (*IL1- β* , *TNF- α* , *NOS2*) (Fig.13 A-C) e alternativa – M2 (*Arginase 1*, *PPAR γ* , *TFG- β* , *CCL2*) (Fig.13 D-F) através do ensaio de PCR e tempo real (125, 126). De maneira interessante, verificamos que não há especificidade na polarização exercida pelos exossomos, já que os macrófagos apresentaram polarização corresponde a ambos os fenótipos, não sendo possível classificar os macrófagos polarizados por esses como M1 ou M2.

Figura 13: Exossomos derivados de ASC induzem a polarização de macrófagos derivados de medula óssea. A expressão dos níveis de mRNA (A) *IL1-β*, (B) *TNF-α*, (C) *NOS2*, (D) *Arginase 1*, (E) *TGF-β* e (F) *CCL2* foi determinada pelo ensaio de RT-qPCR. As barras indicam (média ± DP). **p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle (macrófagos não polarizados).

4.3.5.2 Análise das citocinas

Tendo em vista que os exossomos são capazes de diferenciar os macrófagos derivados de medula óssea, mas não conseguindo distinguir se esses macrófagos teriam um perfil mais pro-inflamatório ou anti-inflamatório pela expressão gênica dos marcadores, avaliamos o perfil de secreção dos macrófagos tratados com exossomos e comparamos com os polarizados para M1, M2. Como esperado, foram encontradas citocinas pró-inflamatórias clássicas como *IFN-γ*, *IL-1ra* no meio condicionado dos macrófagos M1 (Fig. 14A) e citocinas anti-inflamatórias como *IL-4* no meio condicionado dos macrófagos M2 (Fig.14B). No entanto, em consonância com os achados de expressão gênica, os meios Mexo mostram secreção de ambas citocinas pró e anti-inflamatórias, como *MIP-1α*, *IL-1α* e *IL-10* (Fig.14C). Contudo, a fim de excluir uma possível contaminação por fatores transportados pelos exossomos, avaliamos o perfil de citocinas de extratos proteicos dos exossomos derivados de rASC, que apresentam poucas citocinas expressas, o que nos sugere que

as citocinas encontradas no meio condicionado dos macrófagos tratados com exossomos são produzidas por estes (Fig.14D).

Figura 14: Meios condicionados de Mexo apresentam citocinas pró e anti-inflamatórias. As citocinas foram classificadas de acordo com cada perfil analisado. Citocinas secretadas por macrófagos pró-inflamatórios (A) Citocinas secretadas por macrófagos anti-inflamatórios (B). Principais citocinas secretadas pelos macrófagos tratados pelos exossomos (C). Citocinas secretadas pelos exossomos derivados de rASCs (D). A-D, n = 5 / cada.

4.4 Meio condicionado de macrófagos tratados com exossomos é capaz de induzir proliferação de cardiomiócitos submetidos à hipóxia

Sabendo da importância dos macrófagos para o reparo cardíaco, submetemos a cultura de cardiomiócitos de neonatos a hipóxia (1 % O₂) por 24 h e realizamos tratamentos com meio condicionado dos macrófagos polarizados para os perfis M1 e M2 e também os tratados com exossomos (Mexo), a fim de identificar se esse meio era capaz de influenciar a proliferação dos cardiomiócitos e posteriormente identificar os potenciais efetores. A proliferação celular foi avaliada pelo marcador ki67. Observamos que os

cardiomiócitos (células tropomiosina cardíaca positiva) na condição de hipóxia que receberam o meio condicionado dos macrófagos tratados com exossomos apresentaram aumento na taxa de proliferação (Fig. 15 A-D) (PBS $17,91 \pm 5,3$ % versus Mexo $29,67 \pm 7,3$ %) (Fig. 15E). A análise da taxa de proliferação celular também demonstrou um aumento em resposta ao tratamento com o meio condicionado dos macrófagos M2 (PBS $17,91 \pm 5,3$ % versus M2 $26,95 \pm 8,6$ %) (Fig.15E). Entretanto, o tratamento dos cardiomiócitos com o meio condicionado dos macrófagos M1 não aumentou significativamente a taxa de proliferação (PBS $17,91 \pm 5,3$ % versus M1 $24,39 \pm 8,7$ %) (Fig.15E).

Figura 15: Meio condicionado dos macrófagos tratados com exossomos aumenta a taxa de proliferação dos CM quando submetidos às 24h de hipóxia. Imagens representativas (A) do grupo controle, (B) meio condicionado dos macrófagos M1, (C) meio condicionado dos

macrófagos M2 e (D) meio condicionado dos macrófagos tratados com exossomos. Os cardiomiócitos foram marcados com tropomiosina sarcomérica (verde), Ki67 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As barras indicam (média $\pm$ DP) elevação da taxa de proliferação dos cardiomiócitos tratados com meios condicionados de macrófagos em comparação ao controle (E). ** $p < 0,01$.

4.5 Efeitos dos exossomos sobre o reparado do infarto do miocárdio em ratos

Tendo em vista os efeitos pró-regenerativos observados *in vitro* nas células-alvos do coração, avaliamos a capacidade de reparo dos exossomos no coração de ratos adultos infartados.

4.5.1 Avaliação da função cardíaca

Na análise da função cardíaca via ecocardiografia não foram observadas diferenças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) (Fig.16A) e fração de encurtamento entre os grupos tratados com exossomos e controle (Fig 16B).

Figura 16: Avaliação da função cardíaca via ecocardiográfica. (A) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo. (B) Fração de encurtamento. As barras representam (média $\pm$ DP). Sham (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13).

4.5.2 Avaliação morfométrica dos corações

4.5.2.1 Tamanho do infarto

A análise histológica dos corações infartados pela coloração de *Picrossírius Red* não mostrou diferenças no tamanho do infarto, medido pela percentagem média do perímetro do ventrículo esquerdo ocupado por colágeno transmural, entre os grupos (Exo: $42,4 \pm 10,82\%$ e PBS: $42,0 \pm 10,0\%$) (Fig.17).

Figura 17: Avaliação histológica do tamanho do infarto. As barras representam (média $\pm$ DP) do perímetro do ventrículo esquerdo com colágeno transmural (cicatriz). Sham (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13).

4.5.2.2 Perímetro do ventrículo esquerdo e septo

O processo de reparação tecidual pós-infarto agudo do miocárdio envolve a substituição do tecido necrótico por um tecido fibroso, de cicatrização, rico em colágeno. A presença desse tecido neoformado de natureza não-contrátil implica em adaptações do órgão, especialmente morfológicas. O remodelamento ventricular é um processo no qual a arquitetura ventricular é reorganizada em resposta à nova constituição tecidual, traduzindo em alterações da geometria da cavidade do ventrículo esquerdo. A evolução do remodelamento é caracterizada pela dilatação da cavidade, cuja dimensão está diretamente relacionada ao tamanho da lesão e progressiva diminuição da espessura da parede fibrótica.

A análise do perímetro do VE não apresentou diferenças entre os grupos sham: $8,7 \pm 0,9$ mm; Exo $9,8 \pm 0,2$ mm; PBS $9,1 \pm 0,1$ mm (Fig.18A). Assim

como, a espessura do septo sham: $1,8 \pm 0,4$ mm ; Exo $1,9 \pm 0,3$ mm ; PBS $2 \pm 0,5$ mm (Fig. 18B).

Figura 18: Avaliação morfométrica. (A) Análise histológica do perímetro do ventrículo esquerdo (VE) em milímetros. (B) Espessura do septo intraventricular nos diferentes tratamentos. As barras representam (média $\pm$ DP). Sham, (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13).

4.5.2.3 Espessura da cicatriz

Além dos eventos já relatados no remodelamento ventricular, há de se ressaltar também que a parede do ventrículo esquerdo tende a ficar mais fina com a formação da cicatriz de fibrose. A avaliação da espessura da cicatriz, demonstrou que animais injetados com exossomos ($0,76 \pm 0,2$ mm) apresentavam uma cicatriz significativamente mais espessa do que os animais injetados com PSB ($0,46 \pm 0,2$ mm), além de ter sido visualizado tecido viável entre a fibrose cicatricial (Fig. 19).

Figura 19: Avaliação histológica da espessura da cicatriz do ventrículo esquerdo (VE). (A) Quantificação da espessura da cicatriz, as barras representam (média $\pm$ DP). (B) Imagem histológica da borda do infarto, as fibras de colágeno foram observadas através da marcação do Picrossíus Red. Sham, (n = 10); PBS (n = 10); Exossomos (n = 13).

4.5.3 Avaliação do colágeno intersticial

As análises histológicas utilizando *Picrossíus Red* para quantificação das fibras de colágeno não revelaram diferenças significativas quando avaliado tanto a área infartada (parede posterior) (Fig.20A-D) quanto as áreas remotas (colágeno intersticial) (Fig. 21A-D) do ventrículo esquerdo dos animais injetados com exossomos ou PBS.

Figura 20: Avaliação das fibras de colágeno na área infartada. As fibras de colágeno foram observadas através da marcação do Picrosírius Red. As imagens indicam a marcação positiva (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação das fibras de colágeno, normalizadas pela área total de tecido. As barras representam (média ± DP).

Figura 21: Avaliação das fibras de colágeno na área remota. As fibras de colágeno foram observadas através da marcação do Picrosírius Red. As imagens indicam a marcação positiva (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação das fibras de colágeno, normalizadas pela área total de tecido. As barras representam (média ± DP).

4.5.4 Exossomos derivados de rASCs reduzem a apoptose em corações infartados

A coloração por TUNEL de células cardíacas nas zonas limítrofes após o infarto (Fig. 22A-C) revelou que os corações no grupo de exossomos tinham menos núcleos apoptóticos em comparação com o grupo PBS (0,57% vs. controle de 1,4%) (Fig. 22D), sugerindo que os exossomos apresentam um papel cardioprotetor.

Figura 22: Exossomos reduzem a apoptose nos corações infartados. As imagens indicam a marcação positiva para os núcleos apoptóticos. (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação de núcleos apoptóticos, normalizados pela área total de tecido. As barras representam (média $\pm$ DP).

4.5.5 Efeito dos exossomos no infiltrado de células CD68 positivas no tecido cardíaco

A capacidade dos exossomos em modular a infiltração de macrófagos pós-lesão foi avaliada através do ensaio de imunohistoquímica para células CD68 positivas (Fig. 23A-C). Contudo, após quatro semanas da cirurgia do infarto, não foi observado diferenças no número de células CD68 positivas entre os tratamentos com exossomos ou PBS (Fig. 23D)

Figura 23: Infiltrado de macrófagos no tecido cardíaco pós-lesão. O infiltrado foi avaliado pela marcação positiva de células CD68. (A) Sham, (n = 10), (B) PBS (n = 10), (C) Exossomos (n = 13). (D) Quantificação de células CD68 positiva, normalizadas pela área total de tecido. As barras representam (média ± DP).

4.6 Exossomos derivados de rASCs contêm miRNAs envolvidos na regeneração cardíaca

A fim de entender os possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos de cardioproteção dos exossomos, avaliamos o perfil de miRNAs presente nos exossomos utilizando uma análise de *microarray* (728 miRNAs de

ratos maduros). Foram encontrados 116 miRNAs derivados de exossomos (Tabela 3).

Tabela 3: miRNAs derivados de exossomos encontrados na análise de Microarray

miRNA	Intensidade	miRNA	Intensidade	miRNA	Intensidade	miRNA	Intensidade
let-7b-5p	12,16	27a-3p	8,73	342-3p	7,29	193-5p	6,03
24-3p	12,005	221-3p	8,715	27b-3p	7,265	1839-5p	5,935
3473	11,915	30c-5p	8,665	328a-5p	7,25	494-3p	5,875
let-7d-5p	11,615	130a-3p	8,54	500-3p	7,165	532-3p	5,865
31a-5p	11,295	351-5p	8,5	30d-5p	7,14	92b-5p	5,82
125b-5p	11,27	93-5p	8,38	1-3p	7,035	19b-3p	5,73
26a-5p	11,18	222-3p	8,34	181b-5p	7,03	21-5p	5,705
23a-3p	11,13	20a-5p	8,31	30a-5p	7,01	212-3p	5,67
let-7a-5p	11,065	185-5p	8,275	351	6,885	125b-1-3p	5,565
6216	10,89	210-3p	8,175	30b-5p	6,845	423-5p	5,545
23b-3p	10,865	125a-5p	8,16	425-5p	6,715	126a-3p	5,53
let-7e-5p	10,775	652-3p	8,13	28-5p	6,71	542-5p	5,51
191a-5p	10,385	151-5p	8,115	1224	6,645	664-1-5p	5,5
103-3p	10,3	361-5p	7,855	24-2-5p	6,605	34c-5p	5,5
143-3p	10,105	29a-3p	7,805	155-5p	6,57	34c-3p	5,44
145-5p	10,085	15b-5p	7,805	130b-3p	6,545	28-3p	5,345
214-3p	10,06	92a-3p	7,785	208a-5p	6,5	378a-5p	5,305
16-5p	10,005	99a-5p	7,765	1949	6,485	532-5p	5,29
107-3p	9,845	140-3p	7,665	672-5p	6,46	195-5p	5,26
378a-3p	9,695	106b-5p	7,63	324-5p	6,38	30a-3p	5,18
22-3p	9,675	199a-5p	7,575	361	6,38	466b-5p	5,07
let-7i-5p	9,48	100-5p	7,535	151-3p	6,375	490-5p	5,025
199a-3p	9,365	34a-5p	7,46	18a-5p	6,285	324-3p	4,92
99b-5p	9,165	let-7f-5p	7,45	133b-3p	6,235	139-5p	4,865
152-3p	9,035	146a-5p	7,365	298-5p	6,165	708-5p	4,76
181a-5p	8,86	132-3p	7,355	423-3p	6,11	196a-5p	4,725
320-3p	8,78	133a-3p	7,35	25-3p	6,11	328a-3p	4,56
378b	8,765	455-3p	7,345	146b-5p	6,04	379-5p	4,395

Um estudo anterior do nosso grupo avaliou a regeneração do coração de neonatos de rato ressectados com um e sete dias de vida (127). Utilizando o sequenciamento de RNA desse trabalho realizamos uma análise diferencial (miRNA da ressecção x miRNA derivado dos exossomos) para identificar os miRNAs envolvidos na regeneração presentes nos exossomos, . Curiosamente, quatro miRNAs miR-199a, miR-146b, miR-425 e miR196a eram

comuns a ambas listas e foram selecionados para avaliar se eles seriam capazes de recapitular os mesmos efeitos de exossomos in vitro (Fig. 23).

Figura 24: Os cinco miRNAs presentes nos exossomos de rASC e na ressecção de ratos neonatais de um dia de vida.

5. Discussão

Os efeitos cardioprotetores do transplante de células mesenquimais pós-infarto agudo do miocárdio são bem estabelecidos, no entanto, os mecanismos exercidos pela célula mesenquimal ainda carecem de elucidação. Neste trabalho, nós avaliamos os exossomos como potenciais efetores da sinalização parácrina de ASC e verificamos que exossomos exercem papel modulatório nas principais células cardíacas, além de apresentarem uma inibição da apoptose e consequente cicatriz cardíaca mais espessa nos experimentos *in vivo*, sugerindo que exossomos são parte dos mecanismos envolvidos na cardioproteção do transplante de células mesenquimais.

O principal problema no infarto agudo do miocárdio é a morte dos cardiomiócitos decorrente do evento isquêmico e a incapacidade do coração adulto em repor esses cardiomiócitos perdidos, resultando assim na formação de uma cicatriz de fibrose. Dessa forma, a terapia celular busca um balanço entre a regeneração dos cardiomiócitos, revascularização, redução da formação de fibrose e modulação do processo inflamatório no órgão (94). Após o infarto agudo do miocárdio há indução de proliferação de cardiomiócitos na borda do infarto, podendo observar um aumento de cerca de 3% da capacidade proliferativa do coração (128). Entretanto, esse aumento não é capaz de realizar uma regeneração clinicamente relevante. Portanto, promover a capacidade endógena de proliferação de cardiomiócitos após o dano é uma estratégia potencial para alcançar o reparo cardíaco.

Trabalhos usando o modelo de ressecção em corações neonatais demonstraram que estes ainda mantêm sua capacidade proliferativa por alguns dias depois do nascimento (108, 127, 129). Visto que alguns estudos descrevem que os exossomos apresentam um efeito cardioprotetor (83, 130, 131), usamos esta valiosa oportunidade para identificar a capacidade dos exossomos em modular o processo de proliferação nos cardiomiócitos. Em condições basais de cultura, não observamos diferenças entre a taxa de proliferação celular dos cardiomiócitos tratados com PBS ou exossomos. Entretanto, observamos que os exossomos são capazes de aumentar a taxa de proliferação celular dos cardiomiócitos em condições de estresse, aqui

representadas pela hipóxia (Figura 5). A hipóxia gera alterações no metabolismo celular, como a geração de espécies reativas de oxigênio, desequilíbrio na homeostasia do cálcio, assim como a liberação de lactato, originando um ambiente extremamente desfavorável aos cardiomiócitos e desencadeando sinalização de morte celular (5). Contudo, Puente e colaboradores demonstraram que o ambiente pós-natal rico em oxigênio induz a parada do ciclo celular dos cardiomiócitos devido a danos na molécula de DNA (132). Além disso, em um segundo trabalho o mesmo grupo submeteu ratos adultos a hipóxia crônica (1% de oxigênio por dia durante duas semanas) e observaram que hipóxia resultou em um aumento significativo no número de cardiomiócitos e que a principal fonte desses novos cardiomiócitos era os anteriormente não proliferativos (133). Dessa forma, podemos sugerir que em um ambiente já propício à indução da ativação do ciclo celular nos cardiomiócitos, os exossomos potencializam sua proliferação. Essas evidências são corroboradas por alguns trabalhos da literatura que sugeriam que os exossomos derivados de ASC poderiam ativar rapidamente diversas vias de cardioproteção, como aquelas apontadas por reduzir o estresse oxidativo e ativar vias de sinalização de sobrevivência (131). Ferguson e colaboradores demonstraram que os exossomos derivados de rASCs são capazes de reduzir a apoptose de cardiomiócitos tratados com peróxido de hidrogênio (indutor de apoptose), entretanto não conseguiram observar diferenças quanto à proliferação celular (134). Com isso, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar que os exossomos são capazes de aumentar a capacidade proliferativa de cardiomiócitos neonatais.

No miocárdio normal de mamíferos adultos há pelo menos um capilar perto de cada cardiomiócito (135). Assim, a revascularização cardíaca é crucial para os cardiomiócitos remanescentes obterem tanto oxigênio quanto nutrientes, além de reduzir a necrose miocárdica (135, 136). Um dos efeitos mais pronunciados da injeção das rASCs no coração infartado é sua capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (137-139). Nossos resultados sugerem que os exossomos são capazes de ativar a proliferação celular das células endoteliais microvasculares cardíacas uma vez que induzem progressão no ciclo celular (Fig. 7) e também são capazes de

induzir a formação de estruturas tubulares semelhantes a capilares (Fig. 8). Alguns trabalhos utilizando células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) ressaltam importância dos exossomos na estimulação da angiogênese (140, 141). Utilizando estratégias proteômicas, Anderson e colaboradores identificaram que a sinalização via NFkB é um mediador-chave da angiogênese induzida por exossomos derivados de células mesenquimais em células endoteliais (142). Entretanto, nenhum outro trabalho havia utilizado as células endoteliais microvasculares cardíacas para avaliar o efeito dos exossomos. Dessa forma, podemos sugerir que assim como foi observado nas HUVECs os exossomos desempenham papel chave no processo de angiogênese pós-infarto nas células endoteliais cardíacas.

Foi demonstrado que a injeção de rASCs em corações infartados é capaz de melhorar a função cardíaca devido à redução da escara de fibrose, dentre outros fatores (143, 144). Os fibroblastos cardíacos são as principais células envolvidas no remodelamento pós-lesão, sendo moduladores importantes da resposta inflamatória e reparadora e, portanto, promissores alvos terapêuticos. A fase proliferativa do reparo do miocárdio é caracterizada pelo aumento significativo do número de fibroblastos e posterior diferenciação em miofibroblastos (22). De maneira inédita nossos resultados indicam que os exossomos são capazes de reduzir significativamente a taxa proliferação celular dos fibroblastos cardíacos em condições de hipóxia e normóxia (Figura 9). Outra etapa crítica ao remodelamento cardíaco pós-infarto é a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que regulam a expressão gênica de componentes da matriz extracelular que se acumulam durante a fibrose cardíaca como os colágenos do tipo I e III (7, 10, 13). Estas células são caracterizadas pela expressão de α -SMA e utilizando o TGF- β como indutor de diferenciação (122), nossos resultados indicam que o tratamento concomitante com exossomos previne a diferenciação dos fibroblastos cardíacos de neonatos em miofibroblastos, efeito observado pela diminuição na expressão de α -SMA tanto a nível gênico (Fig. 10A) como proteico quando comparado com o tratamento apenas com TGF- β (Fig. 11). Além disso, também observamos que os exossomos reduzem significativamente os níveis de expressão de mRNA dos colágeno tipo I e III (Fig. 10B e C), o que ratifica que

os exossomos podem atuar no processo de remodelamento cardíaco, prevenindo a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos.

A deposição excessiva de matriz extracelular no coração infartado aumenta a rigidez da câmara causando disfunção diastólica. Teng e colaboradores observaram que a injeção de exossomos no coração infartado reduziu significativamente o tamanho do infarto e o remodelamento do ventrículo esquerdo (140). A redução da fibrose cardíaca pela injeção de exossomos também foi observada por Zhao e colaboradores(145) sugerindo que os exossomos modulam a formação da escara fibrótica. Sabe-se que uma fibrose cardíaca atenuada está associada à redução da mortalidade e tem efeitos protetores sobre o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, como já foi avaliado pelo tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores de AT1 (41). Entretanto, o desenvolvimento de estratégias para identificar subgrupos de pacientes com alterações fisiopatológicas distintas representa um passo importante para a implementação de uma terapia eficaz visando a resposta inflamatória e fibrótica no infarto do miocárdio. Estratégias baseadas em biomarcadores são necessárias para identificar indivíduos com respostas inflamatórias hiperativas e pacientes com fibrose excessiva (9).

As células-tronco mesenquimais são potentes moduladoras do sistema imunológico e alguns trabalhos descrevem seu papel anti-inflamatório no pós-infarto (146-148). Nos últimos anos, o papel dos macrófagos cardíacos na homeostase e nas fases do remodelamento cardíaco evoluiu significativamente. Evidências sugerem que, no coração infartado, os macrófagos além de atuarem na remoção de detritos também podem ativar respostas pró-sobrevivência, reparativas e regenerativas (149). O IAM desencadeia uma cascata bifásica de inflamação e remodelação, com a fase aguda envolvendo o influxo precoce de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios (M1), que fagocitam os detritos e secretam citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α para amplificar a resposta inflamatória (150). Na fase de reparo, observa-se a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β pelos macrófagos (M2) que apresentam potencial regenerativo favorecendo a proliferação e limitando a fibrose, e assim prevenindo o remodelamento do

coração (124, 151, 152). Foi sugerido que a subpopulação M2 atuam protegendo os cardiomiócitos isquêmicos da morte, regulam a inflamação após a lesão, estimulam os fibroblastos e as células vasculares e orquestram o reparo pós-lesão (152). Considerando sua abundância, diversidade e plasticidade fenotípica, macrófagos são candidatos atrativos para servir como efetores celulares na lesão e reparo de tecidos. Nesse sentido, a manipulações dos fenótipos dos macrófagos poderiam ser explorados terapeuticamente para melhorar o infarto do miocárdio (18). Verificamos que os exossomos são capazes de diferenciar os macrófagos (Fig.12) e que o meio condicionado desse macrófagos tratados com exossomos (Mexo) apresenta características semelhantes ao meio condicionado dos macrófagos anti-inflamatórios (M2) que é capaz de induzir proliferação celular em cardiomiócitos (Fig. 15). Entretanto não foi possível determinar o perfil dos Mexos através da expressão gênica por qRT-PCR, uma vez que esses expressão genes característicos tanto do ativação clássica como IL1- β , TNF α e NO2 quanto da ativação alternativa como Arg1 e CCL2 (Fig. 13).

Uma estratégia que poderia determinar o perfil dos macrófagos polarizados é a caracterização de moléculas de superfície avaliadas por citometria. Entretanto, o pequeno número de anticorpos disponíveis para rato e a baixa especificidade desses em ratos não nos permitiu a identificação dos diferentes perfis. Frente a isso, decidimos avaliar as principais citocinas presentes nos sobrenadantes dos macrófagos M1, M2 e Mexo a fim de caracterizá-los. Dentre as 28 citocinas analisadas, o meio condicionado dos Mexos, não apresentou um padrão pró- ou anti-inflamatório (Fig. 14). Porém, foi encontrado uma maior expressão das citocina IL-6, CINC-3 (CXCL2), MIP-1 α , IL-10 e IL-1 α quando comparado com ambos os perfis M1 e M2. A citocina IL-6 já foi descrita por apresentar tanto propriedades pró, quanto anti-inflamatórias (153). Estudos do miocárdio infartado mostram que a sinalização de IL-6 durante a resposta aguda pode proteger e preservar o tecido cardíaco, em contrapartida quando a sinalização de IL-6 permanece elevada cronicamente ou a uma produção excessiva da mesma, ocorre indução de hipertrofia e diminui a função contrátil. Assim, IL -6 pode ser tanto protetora quanto patogênica, dependendo da cinética da resposta do hospedeiro (154). A

quimiocina CXCL2 ou MIP2 e a MIP-1 α são proteínas inflamatórias dos macrófagos capazes de orquestrar a infiltração neutrofílica em locais inflamados, como o miocárdio infartado. O recrutamento precoce de neutrófilos aumenta o dano tecidual através da liberação de ROS e (155) foi observado que o bloqueio de CXCL2 durante a isquemia do miocárdio reduziu significativamente o tamanho do infarto em camundongos, oito horas após a reperfusão (156).

A família de citocinas IL-1 desempenha papel crucial na estimulação da resposta inflamatória pós-infarto e está envolvida na patogênese da remodelação cardíaca. Modelos murinos de infarto do miocárdio, demonstraram que a IL-1 α é liberada por cardiomiócitos que estão no processo de apoptose, levando a indução da resposta inflamatória (157, 158). Além disso, camundongos com perda completa da sinalização de IL-1 exibiram uma redução acentuada na expressão de quimiocinas, destacando o papel essencial da IL-1 na resposta inflamatória pós-infarto (159). O reparo tecidual é dependente da ativação de sinais inibitórios endógenos que restringem a reação inflamatória prevenindo a resposta inflamatória descontrolada ou prolongada. Citocinas/moléculas imunorregulatórias/imunossupressoras/anti-inflamatórias são liberados no infarto, suprimindo a síntese de quimiocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais e macrófagos (9). Entre essas moléculas está a IL-10, que é secretada por linfócitos T e macrófagos do tipo M2 (160). A administração de IL-10 em camundongos infartados atenuou a inflamação miocárdica e além de reduzir a disfunção e remodelação do ventrículo esquerdo com efeitos na fibrose e densidade capilar aos 28 dias pós-infarto (161).

Com isso, nossos achados apontam para uma capacidade dos exossomos de ASC em diferenciar os macrófagos de medula óssea (9) (Figuras 12,13 e 14), apesar de não ter sido possível determinar o perfil desses macrófagos. Entretanto, verificamos que o meio condicionado dos macrófagos tratados com os exossomos, assim como o meio condicionado (M2) são capazes de estimular a proliferação em cardiomiócitos neonatais, sugerindo um efeito imunomodulatório (Fig. 15). Todavia, já foi observado que exossomos derivados da célula tronco mesenquimal eram capazes de atenuar a

progressão da aterosclerose mediante a polarização dos macrófagos do perfil M1 para o perfil M2 (145). Além disso, também foi observado que os macrófagos são essenciais para o efeito dos exossomos no infarto agudo do miocárdio. Zhao e colaboradores demonstraram que a depleção sistêmica dos macrófagos reduz a eficácia do tratamento com exossomos. Também observaram que os exossomos eram capazes de converter os macrófagos com perfil inflamatório (M1) em macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2) (145).

Na tentativa de demonstrar que os exossomos também reproduzem os efeitos das rASCs *in vivo* utilizamos um modelo de infarto agudo do miocárdio de artéria fechada em ratas adultas. Embora alguns estudos tenham demonstrado melhora na função cardíaca avaliada pelo ecocardiograma, a mesma não foi encontrada nesse trabalho (Fig.16). Teng e colaboradores mostraram que corações infartados injetados exossomos apresentam uma maior fração de ejeção do ventrículo esquerdo comparado com o tratamento com controle (140). Outro trabalho demonstrou uma melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma melhora na fração de encurtamento quando corações de ratos infartados eram tratados com exossomos (162). Existe, entretanto, uma limitação que deve ser mencionada aqui, apesar da media do tamanho do infarto está similar entre os grupos tratados com exossomos e controle, existe uma variação (aceitável) no tamanho dos infartos dos animais. Como a melhora na função cardíaca pode ser sutil no grupo tratado o ideal seria ter feito uma avaliação ecocardiográfica alguns dias após o infarto e realizada outra com quatro semanas como foi feito.

Apesar de os animais do grupo controle e do grupo tratado com exossomos apresentem tamanho do infarto muito similar (Fig.17), a composição da cicatriz fibrótica é maior no grupo tratado com exossomos (Fig.19) e a marcação de colágeno por vermelho de Picrossirius sugere que a mesma apresenta tecido viável indicando um remodelamento pós o IAM menos acentuado.

As colorações de TUNEL das células cardíacas na borda do infarto revelaram que os corações do grupo tratado com exossomos apresentavam um menor número de células TUNEL positivas (Fig.22). O papel cardioprotetor dos exossomos vem sendo relatado por vários trabalhos. Liu e colaboradores

sugerem que os exossomos são capazes de prevenir a morte celular dos cardiomiócitos induzida pelo estresse oxidativo atuando nas enzimas chave na via de fosforilação oxidativa que foram perdidas durante a lesão de reperfusão isquêmica do miocárdio (130). Além disso, outro trabalho descreve que os exossomos podem aumentar os níveis de ATP, e ativar a via de PIK3/AKT que aumenta a viabilidade miocárdica (163). Dessa forma, apesar dos nossos resultados não terem sido capazes de demonstrar uma melhora cardíaca funcional avaliada pelo ecocardiograma, os resultados da avaliação histológica nos sugerem que o tratamento com exossomos é capaz de induzir uma melhora no coração dos ratos infartados.

Na análise histológica para infiltração de macrófagos no tecido não foi observada diferenças entre os grupos (Fig. 23). Isso pode se dar ao fato de a análise ter sido tardia (4 semanas após a lesão). No que diz respeito ao infiltrado, acreditamos que a janela inicial de 1 até 6 dias após o infarto apresentaria maiores chances de análise da magnitude de inflamação. Vale ressaltar que apesar de não termos observado diferenças na quantidade de macrófagos na lesão, o perfil desses macrófagos poderia ter fenótipos diferentes entre os grupos, como foi observado nos experimentos *in vitro* em que o tratamento dos macrófagos derivados de medula óssea com exossomos apresentou uma modulação no fenótipo dos mesmos. Contudo devido a dificuldades metodológicas (falta de bons anticorpos para rato capazes de determinar as subpopulações) isso não foi possível. Farbehi e colaboradores demonstram que no dia 3 pós-infarto ocorre um influxo de macrófagos M1, porém no dia 7 pós-infarto a população predominante é de macrófagos M2 (10). Dessa maneira, seria interessante avaliar a população de macrófagos em um janela menor pós-infarto.

Haja vista aos efeitos observados pelo tratamento com os exossomos, consideramos de extrema importância à avaliação do seu conteúdo, no intuito de entender os mecanismos de ação desses. Para identificar miRNAs que podem estar regulado às diversas vias estudadas foi realizado uma análise de expressão utilizando um *chiparray* capaz de identificar 728 miRNAs maduros de rato. Foram encontrados 116 miRNAs comuns em todas as nossas amostras (Tabela 3). Os corações neonatais ainda mantêm a capacidade

proliferativa alguns dias após o nascimento. Utilizamos então esta oportunidade valiosa e comparamos o perfil miRNA exossômico com o miRNA de ressecção de corações de ratos com um dia de vida, na tentativa de identificar miRNAs presentes nos exossomos que seriam capazes de induzir a regeneração cardíaca após a lesão. Dessa comparação foram encontrados quatro miRNAs comuns, sendo eles miR-199a, miR-146b, miR-425 e miR196a. Alguns trabalhos envolvendo esses miRNAs já foram publicados. Eulalio e colaboradores, realizaram uma triagem de alto rendimento usando uma biblioteca de miRNA de genoma completo contendo 875 miRNA miméticos para identificar quais miRNAs poderiam promover a proliferação de cardiomiócitos. Entre os miRNAs que induziram a síntese de DNA e aumentaram a citocinese em cardiomiócitos de rato neonatais e adultos, o miR-199a – 3p foi escolhido para estudos adicionais de regeneração em corações adultos. Utilizando de estratégias de sequenciamento, foi identificado que o miR-199a – 3p regulava positivamente genes envolvidos nas vias de ciclo celular, crescimento e proliferação celular e em vias de replicação, recombinação e reparo do DNA, quanto que os genes regulados negativamente estavam envolvidos em vias de estruturação e organização celular. Além disso, foi observado que o miR - 199a - 3p *in vitro* era capaz de induzir proliferação em cardiomiócitos isolados de ratos com sete dias de vida, mas não de fibroblastos cardíacos e *in vivo* utilizando um modelo de infarto do miocárdio com ratas adultas foi relatado que o miR - 199a - 3p reduziu o tamanho da cicatriz fibrótica e melhorou a função cardíaca, consistente com o efeito desse miRNA em estimular ativamente a proliferação de cardiomiócitos (108). Outros trabalhos também mostraram a capacidade do miR - 199a - 3p estimular a proliferação de cardiomiócitos. Ferguson e colaboradores utilizando exossomos enriquecidos com o miR - 199a - 3p demonstraram que esses eram capazes de aumentar a proliferação celular de cardiomiócitos e prevenir a apoptose (134). Utilizando um modelo de infarto em porcos, Gabisonia e colaboradores observaram que a injeção de miR - 199a - 3p nos corações infartados trouxe melhorias na quantidade global da contratilidade, aumento de massa muscular e redução do tamanho do infarto (109).

Evidências apontam para o miR-196a como parte do controle da resposta fibrótica. Um estudo utilizando o modelo de fibrose renal observou que quando essa era induzida havia uma rápida queda dos níveis de expressão de miR-196a / b e que se logo após a indução da fibrose fosse utilizado um plasmídeo que expressa miR-196a / b ocorria uma regulação negativa de proteínas pró-fibróticas, incluindo colágeno do tipo 1 e *alfa* actina de músculo liso. Além disso, eles ainda sugeriram que TGF- β seria um alvo de miR-196a / b (164). Outro trabalho estudando o efeito do miR-196a em excesso no processo de cicatrização de feridas após lesão na pele observou que a o aumento da expressão de miR-196a induz uma redução dos níveis de colágeno I/III secretados, enquanto a redução de miR-196a (utilizando um inibidor) promove um aumento da secreção dos colágenos (165). Similarmente, o miR-425 também foi associado à redução de fibrose. Foi observado que a redução da expressão de miR-425 resulta no aumento da expressão de colágeno 1 e α -SMA e foi confirmado que o alvo direto do miR-425 é o TGF- β (166).

O miR-146b que também é um miRNA-alvo, foi descrito como um regulador negativo de genes envolvidos na resposta inflamatória. Ao avaliar a expressão de miR-146b em um modelo de infarto agudo de rato, Zhao e colaboradores observaram que em resposta ao infarto, há redução nos níveis de miR-146b. No modelo *in vitro* de infarto do miocárdio, a baixa expressão de miR-146b aumentou os fatores inflamatórios, a apoptose vascular, a atividade das caspase-3/8 e a expressão proteica da Bax. Em compensação o aumento da sua expressão foi capaz de reverter esses efeitos. O microRNA-146b também foi demonstrado por regular a via de sinalização PI3K / Akt / NF- κ B para mediar inflamação vascular e apoptose no infarto do miocárdio pelo PTEN (167). A inibição do miR-146b também foi associada a um aumento da apoptose de cardiomiócitos induzida por hipóxia (168). Além disso, outro membro da família, o miR-146a foi descrito como capaz de modular a polarização dos macrófagos. Quando avaliado o nível de expressão de miR-146a em monócitos polarizados, foi observado que esse estava mais expresso em monócitos polarizados para o perfil M2 do que aqueles polarizados para o perfil M1. O aumento da expressão do miR-146a diminuiu significativamente a

produção de marcadores do fenótipo M1, tais como *IL-6*, *IL-12*, *TNF- α* , *CD86* e *iNOS* em macrófagos M1, mas aumentaram a produção de genes marcadores M2 tais como *Arg1*, *CCL17*, *CCL22* e *CD206* em macrófagos M2 (168).

Ademias outros estudos mostraram que miRNAs exossômicos podem aumentar a sobrevivência dos cardiomiócitos pós-infarto (169), reduzir a fibrose cardíaca (134) promover angiogênese (170) e atuar na modulação do processo inflamatório (171). Dessa forma, os miRNAs poderiam ser usados como agentes terapêuticos para promover a reentrada dos cardiomiócitos no ciclo celular, reduzir a formação de cicatriz e melhorar a resposta da função cardíaca pós-lesão.

Podemos considerar o uso dos exossomos como uma promissora estratégia terapêutica, uma vez que além dos efeitos observados neste estudo, eles apresentam tolerância imunológica e possibilidade de serem enriquecidos para melhorar o tropismo celular. Wang e colaboradores utilizando exossomos enriquecidos com um peptídeo de direcionamento para o coração demonstraram que esses aumentam a afinidade pelo órgão alvo (172). Adicionalmente, existe a possibilidade de torná-los carreadores diferenciais por diversas estratégias. Um exemplo, é a eletroporação, que possibilita a inserção de diversas moléculas, inclusive enriquece-os com miRNAs (173). Outro exemplo é a transfecção das células mesenquimais para que possam produzir exossomos enriquecidos com as moléculas desejadas (134). Vandergriff e colaboradores desenvolveram exossomos que foram conjugados com moléculas de "homing", que aumentaram a viabilidade e melhoraram a retenção de órgãos em um modelo de lesão isquêmica / reperfusão em camundongos (174).

Em conjunto, utilizando uma abordagem integrada com modelos celulares, validação *in vivo* e análises *in silico*, nossos dados sugerem que os exossomos derivados do rASCs têm papel importante na reparação cardíaca após o infarto do miocárdio, recapitulando a resposta ao transplante de ASC e suportando a hipótese de que os exossomos são efetores cardioprotetores da sinalização parácrina das células mesenquimais. Além disso, selecionamos miRNAs candidatos para serem testados futuramente no tratamento pós-infarto.

6. Conclusões

O tratamento com exossomos *in vitro*:

- Estimulam a proliferação de cardiomiócitos em hipóxia, mas não em normóxia;
- Induz a proliferação de células endoteliais da microvasculatura cardíaca e promove a formação de estruturas similares a capilares;
- Reduz a proliferação de fibroblastos cardíacos em ambas condições de hipóxia e normóxia;
- Promovem diferenciação em macrófagos derivados de medula óssea e o meio condicionado desses é capaz de induzir proliferação em cardiomiócitos.

O tratamento com exossomos *in vivo*:

- Reduz a apoptose de células cardíacas;
- Produz um espessamento da cicatriz;

Os exossomos carregam miRNAs dentre os quais, os miR-199a, miR-146b, miR-425 e miR196a foram selecionados como possíveis mediadores dos efeitos cardioprotetores;

7. Referências Bibliográficas

1. Organization WH. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. 2018.
2. SUS D. <http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-caoa-de-mortes-no-pais-revela-dados-do-datasus> 2014
3. Cardiologia SBd. <http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>
4. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(12):e67-e492.
5. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1841-75.
6. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324(5923):98-102.
7. Ma Y, de Castro Bras LE, Toba H, Iyer RP, Hall ME, Winniford MD, et al. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch*. 2014;466(6):1113-27.
8. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8):529-41.
9. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-65.
10. Farbehi N, Patrick R, Dorison A, Xaymardan M, Janbandhu V, Wystub-Lis K, et al. Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *Elife*. 2019;8.
11. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159-73.
12. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol*. 2015;30(3):240-5.

13. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;70:74-82.
14. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1-5.
15. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res.* 2012;94(2):276-83.
16. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):88-111.
17. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Ren G, Akrivakis S, Jackson PL, Michael LH, et al. MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H483-92.
18. Frangogiannis NG. Emerging roles for macrophages in cardiac injury: cytoprotection, repair, and regeneration. *J Clin Invest.* 2015;125(8):2927-30.
19. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62:24-35.
20. Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, et al. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(8):555-70.
21. Zhou P, Pu WT. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res.* 2016;118(3):368-70.
22. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 2009;123(2):255-78.
23. Kohl P, Camelliti P, Burton FL, Smith GL. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol.* 2005;38(4 Suppl):45-50.
24. Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksoen M, Alfsnes K, Finsen AV, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac

fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2013;99(1):164-74.

25. Virag JA, Rolle ML, Reece J, Hardouin S, Feigl EO, Murry CE. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1431-40.

26. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995;30(4):537-43.

27. Zymek P, Bujak M, Chatila K, Cieslak A, Thakker G, Entman ML, et al. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(11):2315-23.

28. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* 2012;92(2):635-88.

29. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res.* 2000;48(1):89-100.

30. Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol.* 1994;145(4):868-75.

31. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147(2):325-38.

32. van den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(1):30-7.

33. Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(1):15-26.

34. Dixit P, Katare R. Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:26.

35. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):658-66.

36. Lin Z, Pu WT. Strategies for cardiac regeneration and repair. *Sci Transl Med*. 2014;6(239):239rv1.
37. Parizadeh SM, Jafarzadeh-Esfehani R, Ghandehari M, Parizadeh MR, Ferns GA, Avan A, et al. Stem cell therapy: A novel approach for myocardial infarction. *J Cell Physiol*. 2019.
38. Wen Z, Zheng S, Zhou C, Yuan W, Wang J, Wang T. Bone marrow mesenchymal stem cells for post-myocardial infarction cardiac repair: microRNAs as novel regulators. *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):657-71.
39. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
40. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013;113(6):810-34.
41. Lin FC, Chen WP, Chu PH, Shyu KG, Wen MS. Current Status and Perspectives in Stem Cell Therapy for Heart. *Acta Cardiol Sin*. 2014;30(5):382-94.
42. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013;12(6):689-98.
43. Chou SH, Lin SZ, Kuo WW, Pai P, Lin JY, Lai CH, et al. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):513-29.
44. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):27-35.
45. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
46. Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE, Hare JM. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. *Physiol Rev*. 2016;96(3):1127-68.

47. Gu W, Hong X, Potter C, Qu A, Xu Q. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation*. 2017;24(1).
48. Lemcke H, Voronina N, Steinhoff G, David R. Recent Progress in Stem Cell Modification for Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1909346.
49. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20.
50. Shafei AE, Ali MA, Ghanem HG, Shehata AI, Abdelgawad AA, Handal HR, et al. Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction. *J Gene Med*. 2017;19(12).
51. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
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. Badimon L, Onate B, Vilahur G. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015;68(7):599-611.
54. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-63.
55. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010;21(11):1783-7.
56. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
57. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110(3):349-55.

58. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30(5):804-10.
59. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(6):H2670-6.
60. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 2005;112(2):214-23.
61. Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, et al. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One*. 2010;5(8):e12077.
62. Dariolli R, Naghetini MV, Marques EF, Takimura CK, Jensen LS, Kiers B, et al. Allogeneic pASC transplantation in humanized pigs attenuates cardiac remodeling post-myocardial infarction. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176412.
63. Hwangbo S, Kim J, Her S, Cho H, Lee J. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a rat myocardial infarction model. *Yonsei Med J*. 2010;51(1):69-76.
64. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12(4):459-65.
65. Noiseux N, Ghecchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006;14(6):840-50.
66. Otto Beitnes J, Oie E, Shahdadfar A, Karlsen T, Muller RM, Aakhus S, et al. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1697-709.

67. Schenke-Layland K, Strem BM, Jordan MC, Deemedio MT, Hedrick MH, Roos KP, et al. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J Surg Res.* 2009;153(2):217-23.
68. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept.* 2004;117(1):3-10.
69. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93-8.
70. Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Beygui R, et al. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy.* 2005;7(3):282-91.
71. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskoue BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 2010;107(7):913-22.
72. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, et al. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells.* 2009;27(1):230-7.
73. Gallina C, Turinetto V, Giachino C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells Int.* 2015;2015:765846.
74. Leiker M, Suzuki G, Iyer VS, Canty JM, Jr., Lee T. Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2008;17(8):911-22.
75. Dai W, Hale SL, Kloner RA. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regen Med.* 2007;2(1):63-8.
76. Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC, Gnechi M. Testing the Paracrine Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Using Conditioned Medium. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:445-56.

77. Gnecchi M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:123-46.
78. Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11(4):367-8.
79. Gnecchi M, He H, Melo LG, Noiseaux N, Morello F, de Boer RA, et al. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells.* 2009;27(4):971-9.
80. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(1):229-36; discussion 36-7.
81. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 2011;6(3):206-14.
82. Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:13-27.
83. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2010;4(3):214-22.
84. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):676-705.
85. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-20.
86. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.

87. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89.
88. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(4):575-81.
89. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-28.
90. Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;34(3):214-9.
91. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* 2002;3(5):321-30.
92. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
93. van Rooij E. Cardiac Repair after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2016;374(1):85-7.
94. Kishore R, Khan M. More Than Tiny Sacks: Stem Cell Exosomes as Cell-Free Modality for Cardiac Repair. *Circ Res.* 2016;118(2):330-43.
95. Sun T, Dong YH, Du W, Shi CY, Wang K, Tariq MA, et al. The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction: From Molecular Mechanism to Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).
96. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.
97. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-9.
98. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231-5.
99. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235-40.

100. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-24.
101. Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature.* 2008;451(7177):414-6.
102. Diez J. Do microRNAs regulate myocardial fibrosis? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6(2):88-9.
103. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13027-32.
104. Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, et al. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res.* 2012;110(1):71-81.
105. Nishi H, Ono K, Iwanaga Y, Horie T, Nagao K, Takemura G, et al. MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via Arl2 in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4920-30.
106. Bernardo BC, Gao XM, Winbanks CE, Boey EJ, Tham YK, Kiriazis H, et al. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(43):17615-20.
107. Qian L, Van Laake LW, Huang Y, Liu S, Wendland MF, Srivastava D. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *J Exp Med.* 2011;208(3):549-60.
108. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature.* 2012;492(7429):376-81.
109. Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, Carlucci L, Zentilin L, Secco I, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature.* 2019;569(7756):418-22.
110. Broughton KM, Wang BJ, Firouzi F, Khalafalla F, Dimmeler S, Fernandez-Aviles F, et al. Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. *Circ Res.* 2018;122(8):1151-63.

111. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324(5935):1710-3.

112. Meloni M, Marchetti M, Garner K, Littlejohns B, Sala-Newby G, Xenophontos N, et al. Local inhibition of microRNA-24 improves reparative angiogenesis and left ventricle remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Mol Ther*. 2013;21(7):1390-402.

113. Yin KJ, Olsen K, Hamblin M, Zhang J, Schwendeman SP, Chen YE. Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *J Biol Chem*. 2012;287(32):27055-64.

114. 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(4):315-7.

115. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3 22.

116. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.

117. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(8):E968-77.

118. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.

119. Jensen L, Neri E, Bassaneze V, De Almeida Oliveira NC, Dariolli R, Turaca LT, et al. Integrated molecular, biochemical, and physiological assessment unravels key extraction method mediated influences on rat neonatal cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2018;233(7):5420-30.

120. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25(1):31-40.
121. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 2005;97(11):1093-107.
122. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011;29(5):196-202.
123. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
124. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
125. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
126. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:541-66.
127. Zogbi C, Satri de Carvalho AE, Nakamuta JS, Caceres Vde M, Prando S, Giorgi MC, et al. Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion. *Physiol Rep.* 2014;2(8).
128. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature.* 2013;493(7432):433-6.
129. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science.* 2011;331(6020):1078-80.
130. Liu Z, Xu Y, Wan Y, Gao J, Chu Y, Li J. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Discov.* 2019;5:79.
131. Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, et al. Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote

Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction. *Stem Cells Int.* 2015;2015:659890.

132. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell.* 2014;157(3):565-79.

133. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, Abdisalaam S, Asaithamby A, Santos CX, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature.* 2017;541(7636):222-7.

134. Ferguson SW, Wang J, Lee CJ, Liu M, Neelamegham S, Canty JM, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep.* 2018;8(1):1419.

135. Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(9):1100-13.

136. Hsieh PC, Davis ME, Lisowski LK, Lee RT. Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:51-66.

137. Mazo M, Cemborain A, Gavira JJ, Abizanda G, Arana M, Casado M, et al. Adipose stromal vascular fraction improves cardiac function in chronic myocardial infarction through differentiation and paracrine activity. *Cell Transplant.* 2012;21(5):1023-37.

138. Mazo M, Hernandez S, Gavira JJ, Abizanda G, Arana M, Lopez-Martinez T, et al. Treatment of reperfused ischemia with adipose-derived stem cells in a preclinical Swine model of myocardial infarction. *Cell Transplant.* 2012;21(12):2723-33.

139. Rigol M, Solanes N, Roura S, Roque M, Novensa L, Dantas AP, et al. Allogeneic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(1):83-92.

140. Teng X, Chen L, Chen W, Yang J, Yang Z, Shen Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(6):2415-24.

141. Vrijssen KR, Maring JA, Chamuleau SA, Verhage V, Mol EA, Deddens JC, et al. Exosomes from Cardiomyocyte Progenitor Cells and

Mesenchymal Stem Cells Stimulate Angiogenesis Via EMMPRIN. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(19):2555-65.

142. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, Vesterlund M, Pham MT, Bramlett CS, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. *Stem Cells.* 2016;34(3):601-13.

143. Lin YC, Leu S, Sun CK, Yen CH, Kao YH, Chang LT, et al. Early combined treatment with sildenafil and adipose-derived mesenchymal stem cells preserves heart function in rat dilated cardiomyopathy. *J Transl Med.* 2010;8:88.

144. Zhu XY, Zhang XZ, Xu L, Zhong XY, Ding Q, Chen YX. Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(4):1084-90.

145. Zhao J, Li X, Hu J, Chen F, Qiao S, Sun X, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res.* 2019;115(7):1205-16.

146. Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation.* 2007;30(3-4):97-104.

147. Peng Y, Pan W, Ou Y, Xu W, Kaelber S, Borlongan CV, et al. Extracardiac-Lodged Mesenchymal Stromal Cells Propel an Inflammatory Response Against Myocardial Infarction via Paracrine Effects. *Cell Transplant.* 2016;25(5):929-35.

148. Luger D, Lipinski MJ, Westman PC, Glover DK, Dimastromatteo J, Frias JC, et al. Intravenously Delivered Mesenchymal Stem Cells: Systemic Anti-Inflammatory Effects Improve Left Ventricular Dysfunction in Acute Myocardial Infarction and Ischemic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2017;120(10):1598-613.

149. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1382-92.

150. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(12):733-44.
151. Fujii K, Wang J, Nagai R. Cardioprotective function of cardiac macrophages. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):232-9.
152. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):16029-34.
153. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.
154. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*. 2015;74(1):62-8.
155. Ong SB, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2018;186:73-87.
156. Montecucco F, Lenglet S, Brauersreuther V, Pelli G, Pellieux C, Montessuit C, et al. Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1371-7.
157. Lugin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Feihl F, Waeber B, et al. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J Immunol*. 2015;194(2):499-503.
158. Szekely Y, Arbel YJC, Therapy. A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? 2018;7(1):25-44.
159. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B. *Circ Res*. 2011;108(9):1122-32.
160. Interleukin 10 administration after MI improves left ventricular function in rodents. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2008;5:750.

161. Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res*. 2009;104(2):e9-18.

162. Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(4):387-97.

163. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Aguor EN, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2013;10(3):301-12.

164. Meng J, Li L, Zhao Y, Zhou Z, Zhang M, Li D, et al. MicroRNA-196a/b Mitigate Renal Fibrosis by Targeting TGF-beta Receptor 2. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(10):3006-21.

165. Kashiwama K, Mitsutake N, Matsuse M, Ogi T, Saenko VA, Ujifuku K, et al. miR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2012;132(6):1597-604.

166. Wang L, Liu J, Xu B, Liu YL, Liu Z. Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the plasma represents the progression of fibrosis and heart failure. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(11):626-33.

167. Zhao L, Yang XR, Han X. MicroRNA-146b induces the PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway to reduce vascular inflammation and apoptosis in myocardial infarction by targeting PTEN. *Exp Ther Med*. 2019;17(2):1171-81.

168. Li D, Duan M, Feng Y, Geng L, Li X, Zhang W. MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA. *Mol Immunol*. 2016;77:205-12.

169. Wang K, Jiang Z, Webster KA, Chen J, Hu H, Zhou Y, et al. Enhanced Cardioprotection by Human Endometrium Mesenchymal Stem Cells Driven by Exosomal MicroRNA-21. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(1):209-22.

170. Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci.* 2016;129(11):2182-9.
171. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun.* 2015;6:7321.
172. Wang X, Chen Y, Zhao Z, Meng Q, Yu Y, Sun J, et al. Engineered Exosomes With Ischemic Myocardium-Targeting Peptide for Targeted Therapy in Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(15):e008737.
173. Wahlgren J, De LKT, Brisslert M, Vaziri Sani F, Telemo E, Sunnerhagen P, et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(17):e130.
174. Antes TJ, Middleton RC, Luther KM, Ijichi T, Peck KA, Liu WJ, et al. Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):61.

8. ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Determinação dos exossomos como os responsáveis pelo efeito cardioprotetor parácrino das células tronco mesenquimais pós-infarto agudo do miocárdio”, registrada com o nº 119/16, sob a responsabilidade de Jose Eduardo Krieger e Nathalia Correa de Almeida Oliveira, apresentado pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 07.12.2016

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-08-2016 Término: 31-07-2019
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	48 fêmeas com 7 semanas e 100 neonatos
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 07 de Dezembro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais