

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PÉRICLES NATAN MENDES DA COSTA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE COMPOSTOS  
SINTÉTICOS INDUTORES DO EFEITO IMUNOMODULADOR EM CÉLULAS  
ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Ribeirão Preto  
2022

HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

PÉRICLES NATAN MENDES DA COSTA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE COMPOSTOS  
SINTÉTICOS INDUTORES DO EFEITO IMUNOMODULADOR EM CÉLULAS  
ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Oncologia clínica, Células tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Células-tronco e  
Terapia Celular

Orientadora: Dra Simone Kashima  
Haddad

Ribeirão Preto  
2022

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

Costa, Péricles Natan Mendes da  
Identificação e caracterização funcional de compostos sintéticos indutores do efeito imunomodulador em células estromais mesenquimais, 2022.

106 p.: il.; 30 cm

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

Orientadora: Haddad, Simone Kashima Haddad.

1. Terapia Celular. 2. Células Estromais Mesenquimais. 3. Propriedade Imunomodulatória. 4. Triagem em Larga Escala. 5. Ciclooxigenase-2 e Prostaglandina E2.

Nome: Péricles Natan Mendes da Costa

Título: Identificação e caracterização funcional de compostos sintéticos indutores do efeito imunomodulador em células estromais mesenquimais

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Oncologia clínica, Células tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular

Data da defesa: \_\_/\_\_/\_\_

Presidente da banca/Instituição

Dra Simone Kashima Haddad/Fundação Hemocentro

---

Julgamento: Não Votante

Membro 1/Instituição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Membro 2/Instituição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Membro 3/Instituição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

A dedicatória da realização desta etapa é aos meus pais, Daniel e Ester, e ao meu amor, Leandro. Vocês são meus maiores apoiadores e meu porto seguro. Obrigado por tudo!

## **Agradecimentos**

### **Financiamento e suporte para desenvolvimento do projeto e orientação**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. (Número de Processo: 88882.378939/2019-01). O local de desenvolvimento da proposta foi a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto com os seguintes apoios financeiros: CTC-FAPESP:(2013/08135-2) e INCTC-CNPq (465539/2014-9).

Agradeço a Dra Simone Kashima Haddad pela orientação, planejamento e gerenciamento de insumos para realização da proposta.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer ao meu Deus. Sou grato por toda vez que o Senhor escutou minhas orações e veio ao meu encontro. Fui forte em muitos desafios durante essa jornada graças a muitas palavras de consolo, renovação, força e amparo. Além de todos os anjos que foram colocados na minha vida no momento e local que eu mais precisava. Obrigado Deus por sempre caminhar comigo.

Meus pais, Daniel e Ester, meu anjinho de quatro patas, Douguinho, e meu amor, Leandro. É nessas horas que eu me pergunto, “É possível expressar toda a minha gratidão a vocês somente com palavras?”. Todo amparo, independentemente da sua natureza, proveio de vocês a mim em todo o tempo. Eu amo muito vocês e nas minhas orações sempre peço a Deus que abençoe a vocês com muita saúde e alegria.

Meus familiares e amigos,

Aos meus avós paternos e maternos, meus tios e tias, meus primos e primas, meu sogro, minha sogra, meu cunhado e cunhada, meu sobrinho e meus caros amigos, meu muito obrigado. Mesmo que não participando diretamente de todo este processo eu os agradeço simplesmente por permitirem que eu disfrute de parte dos seus momentos e vocês dos meus.

Ao Hemocentro,

Na Biologia molecular,

Obrigado, Si, Eva, Elaine, Josi, Mari, Ju, Jonnhy, Debs, João, Julliane e Yasmin. Eu agradeço por vocês dividirem seu “espaço” comigo. Nós rimos. Choramos. Fofocamos. Brigamos, às vezes, mas depois passa. E, claro, nós trabalhamos bastante. Agradeço também, toda a experiência emocional e de vivência que vocês me passam. Isto me torna cada vez melhor. Ao Slav e o seus alunos, Victória, Gabriel, Lara e Anielly. Obrigado pelo apoio e parcerias de trabalho. Agradeço também pelas companhias nos cafés e nas idas ao bandex. Desejo muito sucesso a vocês. À equipe COVID. Obrigado Luana, Renata, Lilian, Ana Carla, Wilson, Bruno, Anemari e Adriana. A ajuda de vocês foi crucial em uma etapa do meu trabalho. Agradeço todo o comprometimento e profissionalismo. Também desejo muito sucesso a vocês.

À equipe da Biotecnologia e Transferência Gênica,

Obrigado Virginia, Genoneva, Renata, Elaine, Mário, Amanda, Nádia, Tárík, Saira, Daiane, Mariane, Felipe, Mateus e Mara. Obrigado Lucas, Daiane, Andreza, Rafaela, Izadora, Roberta, Sara e Caio.

À equipe da Citometria, Terapia Celular, Biotério e Biologia Funcional. Obrigado, Patrícia, Camila, Rita e Carmen. Obrigado Maristela, Sâmia, Taísa, Rosane,

Camila, Raíssa, Paula, Carol, Heloísa e Thais. Obrigado Cleide, Bia, Enri e todos os demais membros do LEEA. Obrigado Rodrigo, Felipe, Amanda e Maria Luiza.

Nestes 8 anos de casa,

Sou grato ao profissionalismo, a companhia, a camaradagem, a disponibilidade a amizade e toda a atenção de vocês.

Meu “muito obrigado” também a todos os outros funcionários e bolsistas do Hemocentro. Cada um de vocês é uma “pequena engrenagem” deste grande “motor” que é o nosso centro. É o trabalho em conjunto de vocês que fazem toda esta potência que somos. Muita saúde e sucesso a todos.

## **Epígrafe**

**“Quando a vida decepciona, qual é a solução? Continue a nadar! Continue a nadar! Continue a nadar, nadar, nadar! Para achar a solução, nadar, nadar!”**  
(Personagem Dory, Procurando Nemo 2003 – Disney Pixar)

## RESUMO

Costa, P.N.M. **Identificação e caracterização funcional de compostos sintéticos indutores do efeito imunomodulador em células estromais mesenquimais**. 2022. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Na terapia celular, o uso de células estromais mesenquimais (MSC) se dá pela sua propriedade imunomoduladora. Neste processo, a atividade parácrina das MSC gerencia a efetividade das células do sistema imunológico melhorando o prognóstico de doenças inflamatórias. Neste contexto, as MSC são estimuladas pela citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , levando ao aumento da ciclo-oxigenase dois (COX-2). Isso resulta na síntese de prostaglandina E2 (PGE2): principal fator solúvel liberado pelas MSC. Baseado nisto, propõe-se que moléculas que mimetizam a ação da citocina atuam como novos moduladores de COX-2 e potencializam a ação as MSC na terapia. O objetivo deste estudo foi realizar um ensaio de triagem em larga escala para seleção de novas moléculas com ação sobre a MSC. Foram isoladas MSC de cordão umbilical (n=3) e caracterizadas quanto a morfologia, o perfil imunofenotípico e a capacidade de diferenciação. Após isso, testou-se nas três linhagens a modulação do eixo TNF- $\alpha$  - COX-2 quanto a secreção de PGE2 por ELISA e expressão gênica e proteica de COX-2 por qPCR e *Western Blot* (WB), respectivamente. A linhagem escolhida seguiu para a triagem em larga escala. Para tanto, usou-se qPCR e o método de  $\Delta\Delta CT$ . No ensaio, as células foram tratadas com a condição de modulação positiva TNF- $\alpha$ , modulação negativa DMSO 0,5%, condição controle (somente meio base) e uma biblioteca de 707 moléculas, individualmente, a 50  $\mu M$ . A molécula selecionada na triagem seguiu para a validação por qPCR, WB e curva dose-resposta. As MSC do cordão umbilical (UC-MSC, n=3), apresentaram-se como células aderentes ao plástico e fibroblastoides. Mais de 95% delas foram positivas para CD73, CD90 e CD105 e mostraram ausência (menos de 2%) de marcadores hematopoéticos e HLA-DR. Todas foram capazes de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Dentre as três linhagens, UC-MSC 01-03, a 03 apresentou o maior nível de secreção de PGE2 e acréscimos na expressão gênica e proteica de COX-2. Logo, ela foi a escolhida para a triagem. As sondas de hidrólise para B2M (gene endógeno) e COX-2 (gene alvo) foram otimizadas em cerca de 90% de eficiência e apresentaram comportamento semelhante. Com base na distribuição da expressão gênica dos controles TNF- $\alpha$  e DMSO, foram estabelecidos os parâmetros de seleção. A molécula selecionada foi a indirubina, um produto natural derivado de plantas e apontado na literatura como anti-inflamatório. Nas concentrações de 25 e 50  $\mu M$ , ela aumentou a expressão gênica de COX-2 em cerca 4 a 8 vezes, respectivamente. No WB, essas concentrações demonstraram bandas com maior intensidade em comparação às demais. A curva de dose-resposta indicou que é necessário investigar concentrações mais altas para classificar nível da modulação e determinar o EC50. Até o momento, conclui-se que o ensaio de larga escala proposto foi capaz de selecionar a indirubina como molécula moduladora de COX-2. No entanto, ainda é necessário investigar a intensidade desta modulação e aplicação funcional na propriedade imunomoduladora das UC-MSC.

Palavras-Chave: Terapia Celular; Célula Estromais Mesenquimais; imunomodulação; Triagem em larga escala; indirubina;

## ABSTRACT

Costa, P.N.M. **Identification, and functional characterization of synthetic compounds that induce immunomodulatory effect in mesenchymal stromal cells.** 2022. Doctoral thesis. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

In cell therapy, the mesenchymal stromal cells (MSC) application is due to their immunomodulatory property. In this process, the MSC paracrine effect regulates the immune system cells improving the prognosis of inflammatory diseases. In this context, MSCs are stimulated by the inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  increasing cyclooxygenase two (COX-2) expression. This results in the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2): the main soluble factor released by MSC. Based on this, it is hypothesized that molecules that mimic cytokine role act as new COX-2 modulators and improve MSC in therapy. According to this, our goal was to perform a high throughput screening (HTS) assay to select new molecules. MSCs were isolated from the umbilical cord (n=3). The characterization considered the morphology, the immunophenotypic profile and the ability to differentiate. After that, in the three cell lines obtained the regulation of the TNF- $\alpha$  - COX-2 axis was tested regarding PGE2 secretion by ELISA and gene and protein expression of COX-2 by qPCR and Western Blot (WB), respectively. The chosen cell line was used to perform the HTS by qPCR and the  $\Delta\Delta CT$  method. In the assay, cells were treated to TNF- $\alpha$  for positive modulation, DMSO 0.5% as negative, control condition (only media) and 707 molecules, individually, at 50  $\mu$ M. The molecule selected in the HTS was validated by qPCR, WB, and dose-response curve. Umbilical cord MSC (UC-MSC, n=3) showed as plastic-adherent and spindle cells. More than 95% of them were positive for CD73, CD90 and CD105 and lack (less than 2%) of hematopoietic markers and HLA-DR. All were able to differentiate into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes. Among the three UC-MSC, the sample 03 showed the highest level of PGE2 secretion and COX-2 gene and protein expression and then was chosen for screening. The hydrolysis probes for B2M (endogenous gene) and COX-2 (target gene) were optimized at about 90% efficiency and similar slope. Based on the gene expression distribution of TNF- $\alpha$  and DMSO controls the selection parameters were established. The selected molecule was indirubin, a natural product derived from plants, and mentioned in the literature as an anti-inflammatory. At concentrations of 25 and 50  $\mu$ M, COX-2 gene expression 4 to 8-fold changed, respectively. In WB, these concentrations showed intense bands compared to the others. The dose-response curve indicated that it is necessary to investigate higher concentrations to classify modulation level and determine EC50. So far, it has been concluded that the HTS assay was able to select indirubin as a COX-2 modulator molecule. However, it is still necessary to investigate the intensity of this modulation and functional application in the immunomodulatory property of UC-MSC.

Key words: Cell Therapy; Mesenchymal Stromal Cell; immunomodulation; Large-scale screening; Indirubin;

## Lista de ilustrações

Figura 1- Morfologia e perfil imunofenotípico. ....	34
Figura 2 – Capacidade de diferenciação mesodérmica em células estromais mesenquimais do cordão umbilical. ....	35
Figura 3 – Análise de qPCR para expressão de mRNA de COX-2 e quantificação de PGE2 por ELISA. ....	37
Figura 4 – Análise por qPCR e WB da modulação da expressão de COX-2. ....	38
Figura 5 – Ensaio de co-cultivo. ....	40
Figura 6 – Curvas de eficiência das sondas de hidrólise B2M e COX-2. ....	42
Figura 7 – Análise de qPCR para as condições controle. ....	43
Figura 8 – Alterações decorrentes do tratamento com compostos citotóxicos. ....	44
Figura 9 - Critérios de seleção de amostra na triagem primária. ....	45
Figura 10 – Critérios de seleção de amostras na triagem secundária. ....	49
Figura 11. Estrutura química da indirubina. ....	50
Figura 12 – Nova curva de eficiência. ....	51
Figura 13 – Validação de indirubina como modulador da expressão gênica e proteica de COX-2 e avaliação de curva dose-resposta. ....	53
Figura 14 – Ensaio de imunomodulação para avaliação funcional da indirubina. ....	55
Figura 15 – Avaliação comportamental dos animais. ....	56
Figura 16 – Curva de sobrevivência dos grupos experimentais. ....	59
Figura 17 Coloração do órgão fígado nos grupos experimentais. ....	60
Figura 18 – Avaliação da presença de células humanas nos animais em 11 dias. ....	61
Figura 19 – Avaliação da presença de células humanas nos animais após 15 dias. ....	62
Figura 20 – Curva de sobrevivência dos grupos experimentais no segundo experimento. ....	63

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Moléculas selecionadas na triagem primária.....	45
Tabela 2 - Moléculas de destaque na triagem secundária. ....	50
Tabela 3 – Avaliação comportamental do grupo controle.....	57
Tabela 4 – Avaliação comportamental do Grupo Controle Irradiado. ....	57
Tabela 5 – Avaliação comportamental do Grupo Irradiado e com infusão de $1 \times 10^6$ PBMC. .	58
Tabela 6 – Avaliação comportamental do Grupo Irradiado em infusão de $2,5 \times 10^6$ PBMC.....	58

## **Lista para equação**

Equação 1 – Unidades Relativas de Expressão.....	20
--	----

## **Lista para fórmula**

Fórmula 1 – Comparative $\Delta\Delta CT$ .....	27
---	----

## SUMÁRIO

1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes: aspectos gerais.....	1
1.2 As células estromais mesenquimais do cordão umbilical e as suas aplicações no Hemocentro de Ribeirão Preto .....	3
1.3 O mecanismo imunomodulador das MSC.....	5
1.4 A aplicação das MSC no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD).....	7
1.5 A potencialização de propriedades terapêuticas de MSC por <i>priming</i> e a triagem em larga escala .....	9
1.5 Apresentação da proposta .....	12
2. Objetivos .....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
3. Metodologia.....	15
3.1 Apreciação do projeto em comitê de ética em pesquisa com seres humanos .....	15
3.2 Critérios de seleção e exclusão de doadores de amostras biológicas humanas ...	15
3.3 Isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes do cordão umbilical (UC-MS).....	16
3.4 Caracterização de UC-MS .....	17
3.4.1 Análise morfológica.....	17
3.4.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	17
3.4.3 Diferenciação Mesodérmica.....	17
3.4.3.1 Diferenciação em adipócitos e osteócitos .....	17
3.4.3.2 Diferenciação em condrócitos .....	18
3.5 Seleção de linhagem de UC-MS com expressão destacada no eixo TNF- $\alpha$ - COX-2 .....	19
3.5.1 Ensaio de modulação da expressão gênica COX-2 e avaliação dos níveis de PGE2 após o tratamento com citocina inflamatória TNF- $\alpha$ .....	19
3.5.1.1 Confecção da placa de cultura de células e tratamentos .....	19
3.5.1.2 Extração de RNA, análise de qPCR e ensaio de ELISA.....	19
3.5.2 Validação dos resultados da modulação de COX-2 pelo tratamento com citocina inflamatória .....	20
3.5.2.1 Extração de RNA e Proteínas .....	20
3.5.2.2 Quantificação de proteínas e análise de <i>Western Blot</i> .....	21
3.5.2.3 Análise funcional <i>in vitro</i> da propriedade imunomodulatória pelo ensaio de co-cultivo.....	22
3.5.2.3.1 Confecção da placa de co-cultivo.....	22

3.5.2.3.2 Análise do ensaio de contenção de proliferação de linfócitos .....	24
3.6 Triagem em larga escala por qPCR de moléculas reguladoras de expressão de COX-2 .....	25
3.6.1 Tratamento das UC-MSK com os compostos da biblioteca e a extração de RNA	25
3.6.2 Quantificação de RNA pelo método de curva padrão e síntese de cDNA .....	26
3.6.3 Avaliação de eficiência das sondas de hidrólise.....	26
3.6.4 Triagem em larga escala por qPCR .....	27
3.6.4.1 Triagem primária.....	27
3.6.4.2 Triagem secundária .....	28
3.7 Caracterização de moléculas selecionadas na triagem em larga escala.....	29
3.7.1 Validação da molécula selecionada por qPCR e Western Blot.....	29
3.8 Padronização de análise funcional <i>in vitro</i> e modelo animal murino para GvHD ...	30
3.8.1 Ensaio de imunomodulação para análise funcional <i>in vitro</i> .....	30
3.8.2 Modelo animal murino para GvHD .....	30
3.8.2.1 Camundongos imunodeficientes .....	30
3.8.2.2 Distribuição dos animais em grupos.....	30
3.8.2.3 Etapa de condicionamento por irradiação de corpo total e xenotransplante de PBMC humano .....	31
3.8.2.4 Avaliação da influência do lavador no condicionamento por irradiação de corpo total.....	31
3.8.2.5 Análise do desenvolvimento de GvHD .....	32
3.8.2.5.1 Análise comportamental.....	32
3.8.2.5.2 Monitoramento de linfócitos humanos nos animais xenotransplantados.....	32
3.9 Análise Estatística .....	33
4. Resultados .....	34
4.1 As células isoladas do cordão umbilical cultivadas com PHCS são caracterizadas como células estromais mesenquimais multipotentes.....	34
4.2 A UC-MSK selecionada para a triagem em larga escala apresenta aumento na expressão de ciclo-oxigenase 2 mediante tratamento com citocina inflamatória TNF- $\alpha$ e é uma imunomoduladora funcional.....	36
4.3 A estratégia de modulação de COX-2 por TNF- $\alpha$ pode ser avaliada por qPCR no método de $\Delta\Delta CT$ .....	41
4.4 As triagens primária e secundária elegeram o produto natural indirubina como molécula moduladora de COX-2.....	44
4.5 Resultados preliminares associados a análise funcional <i>in vitro</i> e modelo animal para GvHD .....	54
4.5.1 Ensaio de imunomodulação.....	54
4.5.2 Modelo de GvHD Murino .....	55

<b>5. Discussão.....</b>	<b>64</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>74</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>75</b>
<b>Apêndice A - Aceite do comitê de ética em pesquisa.....</b>	<b>86</b>
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.....	86
<b>Apêndice B – Aceite da Comissão de Ética na Utilização de Animais.....</b>	<b>87</b>
<b>Apêndice C - Lista de compostos citotóxicos .....</b>	<b>89</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes: aspectos gerais

As células estromais mesenquimais (MSC) são representantes de células-tronco multipotentes e, de acordo com a *International Society for Cell Therapy* (ISCT) (DOMINICI *et al.*, 2006), são consideradas como uma população celular heterogênea que em condições padrão de cultura (37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar úmido) são caracterizadas como:

- I. Células aderentes ao plástico e com morfologia fibroblastoide;
- II. Perfil imunofenotípico no qual mais de 95% da população é de células positivas para os marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105 e com ausência (menos de 2%) de marcadores hematopoiéticos (CD14, CD19, CD34 e CD45), e HLA-DR;
- III. Além disso, como células-tronco multipotentes, as MSC têm capacidade de se diferenciar *in vitro* em adipócitos, condroblastos e osteoblastos.

As MSC podem ser isoladas de tecidos adultos, fetais ou obtidas diretamente da diferenciação de células-tronco embrionárias e de pluripotência induzida. Entre os tecidos adultos se destaca a medula óssea, a primeira fonte de obtenção de MSC a ser explorada, seguido do tecido adiposo e a polpa dentária. Para os fetais, tem-se o cordão umbilical (COVAS *et al.*, 2003, 2005; FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974; GRONTHOS *et al.*, 2000; HYNES *et al.*, 2014; IN 'T ANKER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004).

O grande interesse nestas células deve-se ao seu potencial de diferenciação mesodérmica, capacidade de expansão e atividade parácrina (EL OMAR *et al.*, 2014; KOBOLAK *et al.*, 2016; MEIRELLES *et al.*, 2009; MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013; SABAPATHY; KUMAR, 2016). Nas últimas décadas, estas propriedades biológicas tornaram as MSC ferramentas terapêuticas em aplicações pré-clínicas e clínicas. De acordo com o site *ClinicalTrials.gov*, há ensaios clínicos utilizando MSC em estudos em fases iniciais (I, I/II e II) com abordagem em doenças hematológicas, a doença do enxerto contra hospedeiro (do inglês, *Graf versus Host Disease*, GvHD), diabetes, doenças inflamatórias, hepatopatias, doenças renais, pulmonares,

cardiovasculares, ósseas, cartilaginosas, neurológicas e autoimunes (SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016).

## 1.2 As células estromais mesenquimais do cordão umbilical e as suas aplicações no Hemocentro de Ribeirão Preto

O cordão umbilical é a conexão entre o embrião em desenvolvimento e a placenta, sendo composto de duas artérias e uma veia compactadas em um tecido conectivo estromal denominado geleia de Wharton. Cada componente deste tecido fetal é um reservatório de células derivadas do mesênquima, como fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas e MSC (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; SYPECKA; SARNOWSKA, 2015; TERESA CONCONI, 2011; VILLA-DIAZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2004).

É considerado uma fonte substituta à medula óssea para o isolamento de MSC, pois se trata de material biológico destinado ao descarte (ARUTYUNYAN *et al.*, 2016; EL OMAR *et al.*, 2014; MCELREAVEY *et al.*, 1991; VANGSNESS; STERNBERG; HARRIS, 2015). Adicionalmente, o isolamento de MSC do cordão umbilical (do inglês, *umbilical cord mesenchymal stromal cell*, UC-MS) mostra grande eficiência com um rendimento de cerca de  $4,7 \times 10^6$  MSC/cm de cordão umbilical (BONGSO; FONG, 2013; VANGSNESS; STERNBERG; HARRIS, 2015).

Entre suas particularidades tem-se que, por se tratar de uma população celular proveniente de fonte neonatal, as UC-MS) representam células ontogeneticamente jovens em relação àquelas de tecidos adultos (HOFFMANN *et al.*, 2016). Alguns estudos mostram inclusive uma alta expressão de genes embrionários como SOX2, TERT, NANOG e OCT4 (EL OMAR *et al.*, 2014; FONG *et al.*, 2011; TROYER; WEISS, 2008). Adicionalmente, as UC-MS) demonstram alta capacidade proliferativa necessitando de menor tempo para se duplicar em comparação às células estromais da medula óssea (do inglês, *bone marrow mesenchymal stromal cell*, BM-MS) e do tecido adiposo (do inglês, *adipose tissue mesenchymal stromal cell*, AT-MS) (ABU KASIM *et al.*, 2015; EL OMAR *et al.*, 2014).

Desde 2014, o Centro de Terapia Celular (CTC-FAPESP) / Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC-CNPq/FAPESP) sediado no Hemocentro de Ribeirão Preto, dispõe de laboratórios com certificação *Good Manufacturing Practices* (GMP) e acreditação da *American Association for the Advancement of Blood & Biotherapies* (AABB) que permitem realizar o isolamento, criopreservação, cultivo e a distribuição de UC-MS) para terapia celular. Dentro deste contexto, diferentes estudos já foram desenvolvidos,

como: (i) a caracterização de suplementação *xenofree* na qual utiliza-se o plasma humano AB convertido em soro (PHCS) como suplemento alternativo ao soro fetal bovino para expansão e criopreservação destas células; (ii) o método de estocagem de UC-MSc em bolsas de transferência que facilitarão a manipulação e dispensação em uso clínico e (iii) diferentes estratégias para expansão das UC-MSc (DE LIMA PRATA *et al.*, 2012; DOS SANTOS *et al.*, 2017; MIZUKAMI *et al.*, 2016; TOZETTI *et al.*, 2017). Como resultado da associação de parte destes trabalhos e a experiência e a infraestrutura adquirida em um projeto anterior utilizando BM-MSc (DOTOLI *et al.*, 2017), houve uma pesquisa clínica aplicada envolvendo o cultivo de UC-MSc em PHCS para infusão em pacientes com GvHD agudo refratários ao tratamento com corticoides (os dados ainda não foram publicados).

### 1.3 O mecanismo imunomodulador das MSC

A inflamação é o processo responsável pela reestruturação da homeostase de um tecido após lesões (BERNARDO; FIBBE, 2013). Durante o processo, células imunológicas como neutrófilos, monócitos e linfócitos são conduzidos ao sítio de inflamação e lá liberam fatores de crescimento e citocinas que auxiliam o reparo do tecido e atraem outras células, dentre elas as MSC (EL OMAR *et al.*, 2014).

Acredita-se que o endereçamento das MSC ao local é atribuído à expressão de receptores de membrana para fatores de crescimento, matriz extracelular e quimiocinas (MEIRELLES *et al.*, 2009). Uma vez presentes no local, as MSC interagem com as células do sistema imunológico inato e adaptativo modulando sua atividade através de um fenótipo pró ou anti-inflamatório (BERNARDO; FIBBE, 2013; DORRONSORO *et al.*, 2013a; DUNAVIN *et al.*, 2017). Acredita-se que este mecanismo seja mediado por fatores solúveis e mecanismos dependentes de contato celular (DORRONSORO *et al.*, 2013a; GAO *et al.*, 2016).

Os estudos *in vitro* sugerem que o fenótipo pró ou anti-inflamatório das MSC é decorrente do nível de exposição das mesmas às citocinas inflamatórias, como *interferon* (IFN)- $\gamma$  e *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  (BERNARDO; FIBBE, 2013). Na ausência de um ambiente inflamatório ou uma exposição a baixos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as MSC seriam pró-inflamatórias e secretariam interleucina (IL)-6, IL-8, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) e quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (BERNARDO; FIBBE, 2013). Já em um ambiente inflamatório, as MSC seriam imunossupressoras, as quais liberariam fatores solúveis tais como indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), TGF- $\beta$  (do inglês, *transforming growth factor beta*), HGF (do inglês, *hepatocyte growth factor*), HLA-G (do inglês, *human leucocyte antigen*), LIF (do inglês, *leukemia inhibitory factor*) e IL-10 (BERNARDO; FIBBE, 2013; DORRONSORO *et al.*, 2013a).

Dentre os fatores imunossupressores listados, a PGE2 é a molécula principal produzida pelas MSC (SAKATA; YAO; NARUMIYA, 2010). As prostaglandinas são eicosanoides provenientes do metabolismo enzimático do ácido araquidônico mediado pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) 1 e 2 (FUNK, 2001; GALVÃO *et al.*, 2016). Junto com outros eicosanoides, como leucotrienos, lipoxinas, hepoxilinas e citocromo P450, as prostaglandinas são consideradas mediadores lipídicos de

relevância clínica que promovem ou suprimem a inflamação em condições patológicas, como por exemplo asma, aterosclerose e artrite reumatoide (GALVÃO *et al.*, 2016).

A ação da PGE2 nas células do sistema imunológico envolve a transição de fenótipos pró para anti-inflamatório, redução na proliferação e citotoxicidade. Por exemplo, em macrófagos, ela conduz a transição do fenótipo pró-inflamatório M1 para o anti-inflamatório M2 (PROCKOP, 2013). Em um modelo animal de dermatite atópica, a PGE2 de MSC do sangue de cordão umbilical evitou a degranulação de mastócitos (KIM *et al.*, 2015). Em linfócitos, este eicosanoide reduz a secreção de IFN- $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2) e aumenta de *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), resultando em queda de proliferação (DORRONSORO *et al.*, 2013a; SAKATA; YAO; NARUMIYA, 2010). Adicionalmente, em conjunto com IDO e *nitric oxide* (NO), a PGE2 induz o perfil regulador em linfócitos (BERNARDO; FIBBE, 2013). Já em combinação com TGF- $\beta$ 1, há queda da proliferação, toxicidade e secreção de citocinas de células NK (DORRONSORO *et al.*, 2013b). A ação de PGE2 se dá pela ligação da molécula em um dos quatro subtipos de receptores (EP1, EP2, EP3 e EP4) (HARRIS *et al.*, 2002).

#### 1.4 A aplicação das MSC no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD)

O marco para utilização da propriedade imunomoduladora das MSC na terapia celular foi em 2004, quando Le Blanc et al. infundiram MSC haploidênticas e observaram um quadro de melhora em um paciente de 9 anos de idade com GvHD agudo e refratário ao tratamento com corticoides (LE BLANC et al., 2004; MUNNEKE et al., 2016; SUNDIN et al., 2006). O GvHD é uma doença de caráter inflamatório decorrente de um transplante alogênico de medula óssea, no qual células imunológicas competentes presentes no enxerto reconhecem antígenos non-self nos tecidos do hospedeiro e passam a atacá-los (BOIERI et al., 2016).

A patofisiologia do GvHD é fundamentada no condicionamento para transplante de medula óssea: etapa de ablação da medula por meio de irradiação, quimioterapia ou com imunossupressores. Como um efeito adverso, a etapa de condicionamento também causa lesões em tecidos de alta regeneração como epitélio do intestino, pele e fígado. Os danos ao tecido causam a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, que recrutam e ativam células apresentadoras de antígenos (do inglês, *antigen presenting cells*, APC), que processam os fragmentos teciduais em epítomos e passam a apresentá-los aos linfócitos (SCHROEDER; DIPERSIO, 2011). Os linfócitos do enxerto são então ativados após o reconhecimento de antígenos non-self e dão início à expansão clonal (BOLLYKY et al., 2010; SCHROEDER; DIPERSIO, 2011). Uma vez presentes no tecido alvo, a sua citotoxicidade desencadeia os sintomas que são perda de peso, descamações da pele e diarreia (BOLLYKY et al., 2010; SCHROEDER; DIPERSIO, 2011; TESHIMA et al., 2002; THEISS-SUENNEMANN et al., 2015). Clinicamente, a instauração destes primeiros sintomas denomina-se GvHD agudo. A persistência e a evolução do quadro podem levar ao GvHD crônico.

É importante salientar que todo o entendimento dos mecanismos envolvidos no GvHD provém de modelos animais (BOIERI et al., 2016; SCHROEDER; DIPERSIO, 2011). Dentre os modelos apresentados na literatura, o modelo xenogênico em camundongos imunodeficientes NOD.Cg-PkrdcscidIL2rgtmIWjl/Szj (NSG) é o mais adequado para esta proposta. Os animais NSG não apresentam linfócitos T, B e células NK possibilitando o enxerto de células humanas. Para a obtenção do modelo, os camundongos devem ser irradiados com 2-2,5 Gy e receber a infusão de células

humanas mononucleares do sangue periférico (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) (JANG et al., 2014; SCHROEDER; DIPERSIO, 2011). A evolução do GvHD é avaliada pelos seguintes critérios: perda de peso, postura, motilidade, pelagem e integridade da pele. Cada variável é avaliada em um sistema de pontuação que vai de nota 0 (normal), nota 1 (levemente anormal) e nota 2 (anormal). A soma dos pontos varia de 0 a 10 e indica o prognóstico da doença. De acordo com a literatura, os sintomas aparecem por volta de 15 a 25 dias após a infusão de PBMC e o óbito dos animais ocorre após 50 dias (SCHROEDER; DIPERSIO, 2011).

Desde o sucesso da aplicação clínica das MSC por Le Blanc et al. (2004), vários modelos animais e estudos clínicos demonstraram o potencial das MSC na melhora do prognóstico de GvHD (WANG et al., 2014). Sabe-se que as propriedades anti-inflamatórias das MSC apresentam melhor eficácia em doenças inflamatórias agudas e em pacientes refratários a imunossupressores (JANG et al., 2014; ROELOFS et al., 2008; WANG et al., 2014). Diante disto, propôs-se que a eficácia terapêutica das MSC no GvHD se dá pela influência no ambiente inflamatório (WANG et al., 2014). Contudo, espera-se observar variações quanto à resposta à terapia celular com MSC, decorrente da variação do microambiente inflamatório tecidual de cada indivíduo. Adicionalmente, a imunomodulação das MSC também sofre influência da heterogeneidade de doadores de MSC, da fonte anatômica para o isolamento das células, da expansão *ex vivo* e da criopreservação (SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016).

## 1.5 A potencialização de propriedades terapêuticas de MSC por *priming* e a triagem em larga escala

Como descrito anteriormente, o ambiente inflamatório faz com que as MSC adquiram um fenótipo ativado, onde elas liberam fatores solúveis, expressam proteínas de aderência e melhoram mecanismos biológicos associados à sua capacidade imunomoduladora. Este processo de preparação da célula para uma determinada função é conhecido como condicionamento ou, do inglês, *priming* (NORONHA NC *et al.*, 2019).

Na utilização das MSC para terapia celular, a maior adversidade está em mimetizar *in vitro* os aspectos estruturais e moleculares do nicho de origem, garantindo o efeito terapêutico desejado. As estratégias de *priming* buscam então modular o perfil de secretoma das MSC durante a manipulação *in vitro*, garantindo atribuições funcionais potencializadas (NORONHA NC *et al.*, 2019; SRINIVASAN *et al.*, 2022).

De acordo com Noronha *et al.* (2019) e Srinivasan *et al.* (2022), a potencialização de propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras das MSC pode basear-se em tratamentos prévios com: (i) citocinas pró-inflamatórias (CHINNADURAI *et al.*, 2016; PRASANNA *et al.*, 2010; REDONDO-CASTRO *et al.*, 2017; ROVIRA GONZALEZ *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018a); (ii) padrões moleculares associados a patógenos (QIU *et al.*, 2017; SANGIORGI *et al.*, 2016; WATERMAN *et al.*, 2010); (iii) agentes químicos e produtos naturais (LI *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2016); (iv) tecnologias de cultivo como hipóxia (HYLAND *et al.*, 2020; WOBMA *et al.*, 2018), uso de micro-carreadores para culturas tridimensionais (LAM *et al.*, 2017; YLÖSTALO *et al.*, 2012) e cultivo sobre biomateriais (BARTOSH *et al.*, 2010) ou a (v) seleção prévia de células baseado em tamanho (YIN *et al.*, 2018, 2020).

Alternativamente à utilização das células está o uso do meio condicionado pelas MSC. Neste caso, as células são pré-tratadas com fatores de crescimento, proteoglicanos, vitaminas, hormônios ou qualquer outra molécula que potencialize o seu secretoma. Posteriormente, há a troca por um meio basal e o cultivo das MSC nele por 24 a 48 horas faz com que as células o enriqueçam com os fatores solúveis de interesse e o tornam um produto disponível à terapia. O desafio nesta abordagem é estabelecer o melhor ponto de coleta do fator de interesse, a densidade celular adequada e a escalabilidade entre a cultura de monocamada e o uso de biorreatores

(BRUNNER et al., 2010; CHEN et al., 2018, 2019b; LAM et al., 2021; LI et al., 2017; ROBB et al., 2019; SAGARADZE et al., 2019; SHEKARAN et al., 2015; SRINIVASAN et al., 2022).

Destaca-se também como método para potencialização das propriedades imunomodulatórias as modificações genéticas. De forma simples, trata-se da alteração genética das MSC para que eles super expressem proteínas de interesse. Como exemplo, cita-se o uso de MSC modificadas geneticamente para super expressão de IL-10 em modelos animais de isquemia e infarto para estimulação de angiogênese, modulação da inflamação, cicatrização de feridas e recuperação de função motora (MENG *et al.*, 2018; NAKAJIMA *et al.*, 2017; SRINIVASAN *et al.*, 2022; XIAO *et al.*, 2019).

Em contrapartida, esta tecnologia também pode ser utilizada para potencializar o efeito pró-inflamatório das MSC. No contexto de imunoterapia do câncer, MSC foram modificadas para super expressão de IL-7 e IL-12, essencial para o funcionamento do sistema imunológico adaptativo e a ação de linfócitos T auxiliares do tipo 1, respectivamente. A presença destas moléculas contribuiu para a ação de células T modificadas com receptor quimérico para antígenos tumorais (HOMBACH *et al.*, 2020; SRINIVASAN *et al.*, 2022). Embora a potencialização das MSC por engenharia genética seja uma estratégia promissora, há poucos ensaios clínicos de fase I e II em andamento. A baixa aderência é devido a questões de segurança e controle de qualidade exigidos por produtos celulares obtidos desta forma (SRINIVASAN *et al.*, 2022).

Em meio a diversidade de métodos para a potencialização das MSC, o *priming* com agentes químicos e produtos naturais é a melhor alternativa, pois utiliza tecnologia simples e acessível, como o cultivo de células em monocamada, e emprega moléculas com processo de síntese bem estabelecido e com menor valor agregado. O mecanismo de ação é uma ativação *in situ* rápida que leva a uma mudança de fenótipo transiente, o que diminui a chance de efeitos adversos. (LO CICERO *et al.*, 2016; SRINIVASAN *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2016)

A aceleração da descoberta de novos agentes químicos e produtos naturais para o *priming* de MSC deve-se ao aprimoramento de tecnologias de triagem em larga escala (do inglês, *high throughput screening*, HTS) e uso de biblioteca de compostos. As técnicas de HTS são processos que permitem em uma única vez testar um grande número de moléculas para seleção de um alvo de interesse (HAJARE *et al.*, 2013).

Para moduladores de mecanismos biológicos, por exemplo, utiliza-se técnicas relacionados à colorimetria, absorvância, luminescência e fluorescência em ensaios direcionados a expressão gênica, interação receptor – ligante, interações de proteínas ou ensaios enzimáticos (ALVES *et al.*, 2011; BARA *et al.*, 2015; BREY *et al.*, 2011; CRUZ *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2020; ENTZEROTH; FLOTOW; CONDRON, 2009; HAJARE *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2008; LO CICERO *et al.*, 2016; WALMSLEY *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016).

As bibliotecas são coleções de moléculas utilizadas para identificação de novos alvos. Elas partem de um simples princípio de probabilidade: há maior chance de ocorrer um evento favorável em amplo espaço amostral. Neste caso, o espaço amostral é miniaturizado em placas 96, 384 ou 1536 poços o que favorece a distribuição de amostras em grande diversidade. Adicionalmente, as bibliotecas tornam a HTS mais barata, pois permite a ampla diversidade em pequenas quantidades (10-100 µL por unidade) (ENTZEROTH; FLOTOW; CONDRON, 2009; HAJARE *et al.*, 2013; NCATS, 2022).

Outra vantagem é que as moléculas ali presentes são caracterizadas em relação à estrutura, biodisponibilidade e bioatividade, o que facilita a instauração de futuros ensaios clínicos. Além disso, esta abordagem contempla o reposicionamento de fármacos (*drug repurposing*) na qual medicamentos já conhecidos se mostram úteis para outros propósitos. Por fim, as bibliotecas também podem ser usadas para validação de ensaios, identificação de novos controles, caracterização de vias metabólicas e síntese guiada (ENTZEROTH; FLOTOW; CONDRON, 2009; HAJARE *et al.*, 2013; NCATS, 2022).

## 1.5 Apresentação da proposta

Como descrito acima, o uso de MSC na terapia celular se dá em grande parte pela sua propriedade imunomoduladora. Neste processo, as MSC liberam fatores solúveis que gerenciam as células do sistema imunológico melhorando o prognóstico de doenças inflamatórias. É sabido, por exemplo, que no ambiente inflamatório as MSC são estimuladas pela citocina inflamatória TNF- $\alpha$  e aumentam a expressão de COX-2. Isso resulta na síntese de PGE2, principal fator solúvel liberado pelas MSC, que diminui a proliferação e citotoxicidade de linfócitos.

Adicionalmente, o Hemocentro de Ribeirão Preto possui creditações e estrutura para o cultivo e a distribuição de UC-MSc para terapia celular. Este produto ganha mais relevância com a junção da tecnologia do plasma humano convertido em soro (PHCS) pois torna-o um terapêutico com menor risco de imunogenicidade para o paciente. Atualmente, a infusão de UC-MSc expandidas em PHCS é utilizado para tratamento de GvHD, doença inflamatória decorrente de complicações em transplante de medula óssea.

Em paralelo, o advento do *priming* proporciona a potencialização *in vitro* das propriedades biológicas de interesse das MSC e maior eficácia terapêutica. Frente a diversidade de técnicas empregadas neste contexto, ressalta-se a abordagem de *priming* com agentes químicos. Este método chama a atenção pelo impacto na terapia celular pois confere simplicidade, rapidez, menor demanda financeira e facilita a translação de pesquisa básica à aplicada. A seleção de agentes químicos alvo para o *priming* foi alavancado pelo uso das técnicas de HTS e bibliotecas de compostos.

Diante destas vertentes, foi proposta a seguinte hipótese:

Moléculas que mimetizam a ação da citocina inflamatória atuam como novos moduladores de COX-2 e melhoram a propriedade imunomoduladora das UC-MSc usadas como terapia.

Para avaliação desta hipótese, linhagens de UC-MSc foram isoladas e caracterizadas usando o PHCS. Posteriormente, baseado em análises de expressão gênica e proteica de COX-2, selecionou-se dentre as linhagens àquela com melhor resposta ao tratamento com a citocina inflamatória TNF- $\alpha$ . O passo seguinte foi realizar um ensaio de qPCR em larga escala no qual o nível de expressão gênica do

eixo TNF- $\alpha$  – COX-2 estabeleceu parâmetros para seleção de moléculas em uma biblioteca de compostos (n=707) fornecida pelo *National Institute of Health* (NIH) no programa *National Center for Advancing Translational Science – Small Molecule Resource*.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver um ensaio de para selecionar compostos moduladores de COX-2 em UC-MSC isoladas e expandidas com meio cultura suplementado com PHCS. Posteriormente, avaliar o potencial imunomodulador das células tratadas com compostos selecionados *in vitro* através do ensaio de proliferação de linfócitos estimulados.

### 2.2 Objetivos específicos

- i. Isolar as UC-MSC (n=3) utilizando meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com PHCS e caracterizá-las;
- ii. Selecionar dentre as três linhagens, aquela com incremento de expressão gênica e proteica de COX-2;
- iii. Avaliar o potencial imunomodulador *in vitro* da célula selecionada;
- iv. Baseado no eixo de expressão gênica TNF- $\alpha$ /COX-2, otimizar sondas de hidrólise para o método de *Comparative CT* ( $\Delta\Delta CT$ )
- v. Elaborar um ensaio com a técnica de qPCR e selecionar dentre 707 compostos, moléculas potencializadoras do mecanismo biológico de interesse;
- vi. Caracterizar as moléculas selecionadas em relação a modulação da expressão gênica e proteica de COX-2, a concentração que garante a metade da produção máxima de PGE2 (EC50) pela UC-MSC e a cinética de PGE2 por UC-MSC previamente estimulada;
- vii. Comparar *in vitro* e *in vivo* a potencialização da propriedade imunomoduladora de UC-MSC previamente estimuladas com àquelas não estimuladas

### **3. Metodologia**

#### **3.1 Apreciação do projeto em comitê de ética em pesquisa com seres humanos**

O projeto foi avaliado e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas para a coleta de amostras humanas e o biorrepositório (Processo HCRP n°313/2018) (Apêndice A). O mesmo foi feito para o uso de animais na Comissão de Ética na Utilização de Animais (número de processo: 189/2019) (Apêndice B).

#### **3.2 Critérios de seleção e exclusão de doadores de amostras biológicas humanas**

##### **a) Cordão Umbilical**

Os critérios de seleção e exclusão para doadores de cordão umbilical foram adotados de acordo com Prata *et al.* (2011). As amostras de cordão umbilical (n=3) foram obtidas a partir de recém-nascidos a termo (>37 semanas de gestação), saudáveis, nascidos por parto cesárea, no Centro de Referência à Saúde da Mulher - Mater. Os critérios de exclusão foram: (i) recém-nascidos por parto normal; (ii) gestantes com rompimento de bolsa maior que 18 horas antes do parto; (iii) ou cuja temperatura corporal for maior que 38°C durante o parto; (iv) ou com sorologia positiva para HIV, HBsAg, HCV ou HTLV durante o pré-natal. A autorização para coleta de cordão umbilical foi dada pela mãe do recém-nascido. Uma vez de acordo, a mãe cedeu também amostra de sangue periférico para a triagem sorológica. A quantidade de sangue coletada e o número de tubos foi de acordo com o preconizado para a triagem de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto.

No centro obstétrico, após a secção do cordão pelo obstetra, a coleta de um fragmento de 8 cm de cordão umbilical foi feita dos anexos fetais destinados ao descarte. O procedimento foi realizado por um enfermeiro sob condições de assepsia.

##### **b) Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

As amostras de sangue total foram coletadas de candidatos a doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto. Os indivíduos (n=3) foram adultos, ambos os sexos, gozando de boa saúde e apresentaram sorologia negativa para HIV, HBsAg, HCV ou HTLV.

### **3.3 Isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes do cordão umbilical (UC-MSC)**

Para o isolamento, primeiramente, o cordão umbilical foi lavado com PBS 1X. Em uma placa de 100 mm (Greiner®), o cordão foi fragmentado com o auxílio de bisturi. Os fragmentos foram colocados em frascos do tipo *spinner* e sobre eles adicionou-se 200 mL de meio  $\alpha$ -modified minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (Gibco-BRL) suplementado com 100 U/mL penicilina (Gibco-BRL) e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina (Gibco-BRL) e 400  $\mu$ L de colagenase IA (Merck) a 100 mg/mL. O sistema foi incubado a 37°C sob agitação de 50 rpm por 16 horas.

Posteriormente, a colagenase foi inativada com 200 mL de meio de cultura RPMI (Gibco-BRL) suplementado com 5% PHCS e o sistema foi incubado por mais 10 minutos sob agitação de 50 rpm. Passada esta etapa, a suspensão resultante foi fracionada em tubos de fundo cônico de 50 mL (Greiner®) sendo que em cada um acrescentou-se 20 mL de suspensão e 30 mL de PBS 1X. Os tubos seguiram para centrifugação (330 x g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi retirado com pipeta sorológica e os precipitados obtidos foram lavados com PBS 1X.

Após mais uma etapa de centrifugação, os precipitados resultantes foram juntados e ressuspendidos em 25 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de PHCS e 1% pen/strepto ( $\alpha$ -MEM 10% PHCS). Uma alíquota de 50  $\mu$ L foi retirada da suspensão para a contagem de células na câmara de Neubauer utilizando o método de exclusão por azul de Tripan. Cerca de  $7,5 \times 10^7$  células foram plaqueadas em garrafas de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (Greiner®) utilizando 30 mL de meio de cultura  $\alpha$ -MEM 10% PHCS. As garrafas de cultura foram armazenadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4 Caracterização de UC-MSC**

#### **3.4.1 Análise morfológica**

Na passagem 4, foram adquiridas imagens das linhagens de UC-MSC. Para tanto, foi utilizado o microscópio óptico Olympus IX73. As imagens foram adquiridas em contraste de fase em escala de aumento de 4X.

#### **3.4.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo**

Para este ensaio,  $1 \times 10^5$  células foram incubadas em temperatura ambiente com 5  $\mu$ L de anticorpos (Becton Dickinson) marcados com fluorocromos FITC, PE, PerCP e APC: anti-CD14, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105 e anti-HLA-DR. Logo depois, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos no escuro. Após este período, adicionou-se 2 mL de PBS 1X e foi feita uma centrifugação a 330 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspendido em 200  $\mu$ L de PBS 1X. A aquisição e a análise foram realizadas no citômetro FACSCalibur™ (Becton Dickinson) e *Software MultiSet* (Becton Dickinson).

#### **3.4.3 Diferenciação Mesodérmica**

##### **3.4.3.1 Diferenciação em adipócitos e osteócitos**

Para a diferenciação em adipócitos e osteócitos, as células foram semeadas em placas de 24 poços (Greiner®) em densidades de  $2 \times 10^4$  e  $4 \times 10^4$  células/poço, respectivamente. A densidade celular do grupo controle em ambos os experimentos foi de  $5 \times 10^3$  células/poço. As células foram plaqueadas no dia anterior ao do ensaio e foram cultivadas com 1 mL de meio  $\alpha$ -MEM 10 % PHCS.

No dia seguinte, os poços destinados à diferenciação adipogênica receberam 1 mL de meio indutor:  $\alpha$ -MEM 10 % PHCS suplementado na hora do uso com  $3,44 \times 10^{-3}$  mM de insulina (Sigma-Aldrich), 0,2 mM indometacina (Sigma-Aldrich) e 0,02 mM dexametasona (Sigma- Aldrich). Os poços controle foram cultivados em  $\alpha$ -MEM 10 % PHCS. A troca de meio indutor foi feita duas vezes por semana e seguiu-se com este

cultivo até o aparecimento de vesículas lipídicas visíveis no microscópio de contraste de fase, coradas posteriormente por meio da coloração com o corante *Oil Red O* (Sigma-Aldrich).

Para os poços destinados à diferenciação osteogênica, 0,5 mL do volume de 10 % PHCS foi retirado e em seguida adicionou-se 0,5 mL de meio indutor:  $\alpha$ -MEM 10 % PHCS suplementado com 0,4 mM ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 20 mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma-Aldrich) e 0,0002 mM dexametasona (Sigma-Aldrich). Os poços controle foram cultivados da mesma maneira, no entanto, somente com em  $\alpha$ -MEM 10 % PHCS. Foram feitas duas trocas de meio indutor por semana. A cada troca foram retirados 0,5 mL de meio indutor metabolizado pelas células e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL de meio indutor preparado a fresco. O cultivo seguiu-se até a visualização de deposição mineral de oxalato de cálcio em microscópio de contraste de fase, corado posteriormente com o corante *Alizarin Red S* (Fluka Analytical).

### 3.4.3.2 Diferenciação em condrócitos

Para este ensaio foi utilizado a cultura de células em aglomerados tridimensionais (WALKER *et al.*, 2011). Para tanto foram feitas duas suspensões celulares, ambas com densidade celular de  $1 \times 10^6$  células/mL e volume final de 0,8 mL. A primeira suspensão continha células destinadas a diferenciação e foi feita com meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 0,1 mM piruvato de sódio (Thermo Fisher Scientific), 0,05 mM ácido ascórbico, 0,001 mM dexametasona (Merck), 0,04% albumina humana (Vialeblex) e 0,02  $\mu$ g/mL TGF- $\beta$ 3 (Prepotech). A segunda suspensão (controle do ensaio) foi feita com o meio D-MEM suplementado 0,04% albumina humana (Vialeblex).

Em uma placa de 96 poços com poços em formato em "U" e de baixa aderência (Corning®), as suspensões foram plaqueadas em triplicata com volume de 200  $\mu$ L ( $2,5 \times 10^5$  células). Depois de semeada, a placa de cultura seguiu para a centrifugação a 500 x g por 5 minutos para formação dos aglomerados tridimensionais e em seguida armazenada em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O cultivo foi feito por 30 dias com trocas de meio a cada 3-4 dias. É importante ressaltar que o TGF-  $\beta$ 3 foi adicionado sempre na troca de meio, numa proporção de 20  $\mu$ L a cada 1 mL de meio indutor de diferenciação. Passados os 30 dias, os aglomerados tridimensionais

foram fixados por 5 minutos com paraformaldeído 4%. Em seguida, desidratados em bateria de álcool (70, 80, 90 e 100%) e xilol (I, II e III), sendo o período de incubação de 5 e 3 minutos em cada ponto, respectivamente. Após o processamento, o produto resultante foi incluído em parafina para cortes histológicos. Os cortes foram feitos a 5-7  $\mu\text{m}$  de espessura e processados para coloração de Tricomo de Masson.

### **3.5 Seleção de linhagem de UC-MSC com expressão destacada no eixo TNF- $\alpha$ - COX-2**

#### **3.5.1 Ensaio de modulação da expressão gênica COX-2 e avaliação dos níveis de PGE2 após o tratamento com citocina inflamatória TNF- $\alpha$**

##### **3.5.1.1 Confeção da placa de cultura de células e tratamentos**

Primeiramente, as linhagens de UC-MSC (01-03) foram plaqueadas em placas de 24 poços (Greiner®) com densidade celular de  $3,6 \times 10^4$  células/poço utilizando o meio de cultura  $\alpha$ -MEM 10% PHCS. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e os poços de cada linhagem foram divididos em duplicatas e em três condições de tratamento: TNF- $\alpha$ , DMSO e controle (CTRL). No tratamento TNF- $\alpha$ , as células receberam 400  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -MEM 10% PHCS suplementado com 100 ng/mL de TNF- $\alpha$  (Sigma Aldrich). No DMSO, 400  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -MEM 10% PHCS suplementado com DMSO a 0,5%. Já no CTRL, os poços receberam somente 400  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -MEM 10% PHCS. Em seguida, as células foram cultivadas em cada condição por 24 e 72 horas.

##### **3.5.1.2 Extração de RNA, análise de qPCR e ensaio de ELISA**

Após cada período de tratamento, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e o RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante do RNeasy mini kit (Qiagen). Para a síntese de cDNA foi utilizado o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). A reação foi feita com 200 ng de RNA total de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA obtido foi diluído na proporção de 1:10 para as reações de qPCR que consistiu em: 5  $\mu\text{L}$  de Taqman™ Universal Master Mix II (Applied Biosystems), 0,5  $\mu\text{L}$  de sondas de hidrólise Taqman™ (Life Technologies), 2,5  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O Nuclease-free

(MerckMillipore) e 2 µL de cDNA 1:10 totalizando 10 µL. A reação foi amplificada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes etapas de ciclagem: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As seguintes sondas foram utilizadas: ACTB (4310881E - Thermo Fisher SCIENTIFIC) e B2M (Hs99999907\_m1 - Thermo Fisher SCIENTIFIC) e COX-2 (HS00153133\_m1 - Thermo Fisher SCIENTIFIC). O nível de expressão do mRNA de COX-2 foi calculado utilizando a equação (1) (ALBESIANO et al., 2003).

Equação 1 – Unidades Relativas de Expressão

$$URE = 10^4 / 2^{\Delta Cq}$$

Onde CQ é a abreviação de ciclo de quantificação e  $\Delta CQ$  a diferença entre o CQ médio do gene alvo e o CQ obtido da média geométrica dos genes endógenos.

Em paralelo ao procedimento de extração de RNA, o sobrenadante dos poços referentes a cada condição de tratamento foi coletado e armazenado em -20°C até o momento do uso. Posteriormente, o sobrenadante foi processado para quantificação de PGE2 de acordo com as orientações do Prostaglandin E2 parameter assay kit (R&D System).

### **3.5.2 Validação dos resultados da modulação de COX-2 pelo tratamento com citocina inflamatória**

#### **3.5.2.1 Extração de RNA e Proteínas**

Para validar os resultados da etapa **3.5.1**, as células foram plaqueadas em sextuplicata em placas de 24 poços na densidade celular de  $3,6 \times 10^6$  células/poço nas condições de TNF- $\alpha$ , DMSO e CTRL como descrito acima. O período de tratamento utilizado desta vez foi aquele que garantiu maior expressão gênica no experimento anterior. Foram feitas placas para coleta de RNA e proteínas.

O processo de extração de RNA, síntese de cDNA e a reação de qPCR foram feitas como descritas no item anterior. Para a extração de proteínas, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X. Posteriormente, as placas foram apoiadas em banho de gelo e adicionou-se a monocamada de células do primeiro poço cerca de

150  $\mu$ L de tampão de extração RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5%  $C_{24}H_{39}NaO_4$ , 0,1% SDS e 0,5 mM Tris-HCl pH= 8,0) (Sigma-Aldrich) 1% Inibidor de fosfatases (Sigma-Aldrich) 10% Inibidor de proteases (Sigma-Aldrich)). Utilizando a ponteira, espalhou-se o tampão de extração pela monocamada e rompeu-se as células. Para concentrar o extrato, coletou-se este mesmo volume e passou para o próximo poço e repetiu-se o procedimento. Após esta etapa foi feita uma centrifugação a 20.000  $\times g$  por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em -80°C até o momento do uso.

### 3.5.2.2 Quantificação de proteínas e análise de *Western Blot*

A quantificação foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tanto foi feita uma curva padrão com albumina bovina sérica (BSA) (0,025; 0,050, 0,075 e 0,100  $\mu$ g/ $\mu$ L) e as amostras foram diluídas nas proporções de 1:20 e 1:50. A reação com o reagente de Bradford (BIO-RAD) foi feita a partir da mistura de 20  $\mu$ L de extrato com 200  $\mu$ L do reagente por cinco minutos. As absorbâncias das reações foram mensuradas em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices) em 595 nm.

A separação de proteínas por gel de eletroforese de poliacrilamida foi feita de acordo com o preconizado por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Para cada extrato foi coletado o volume correspondente a 20  $\mu$ g de proteína total. O volume contendo tal massa foi misturado proporcionalmente ao tampão de amostra NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 20% de  $\beta$ -Mercapto (Sigma-Aldrich). Posteriormente, as amostras foram postas em banho maria a 95°C por 10 minutos no equipamento Thermomix C (Eppendorf). Em seguida, elas foram aplicadas em gel de eletroforese de poliacrilamida 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels. Foi aplicado 5  $\mu$ L do padrão de corrida Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) e o tampão de corrida utilizado foi o 10X Tris/Glycine/SDS Buffer (BIO-RAD). As condições de corrida aplicadas foram de 40 V, 12 mA, 10W por três a quatro horas.

Após a corrida de eletroforese, os géis seguiram para a etapa de transferência. Para tanto, foram utilizadas membranas de PVDF (GE Healthcare) previamente incubadas em Metanol 100% (Sigma-Aldrich) por 5 minutos (etapa de ativação da membrana). Gel e membranas foram empacotados e, posteriormente, colocadas no

sistema de eletroforese contendo o tampão de transferência (Tris-base 25 mM (Sigma-Aldrich), glicina 192 M (Sigma-Aldrich) e Metanol 20%). A corrida de transferência foi feita a 35 V, 300 mA e por uma hora e 20 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas por uma hora em tampão TBS-T (Tris-HCl (Invitrogen) 20 mM, NaCl (Sigma-Aldrich) 100 mM, Tween 20 0,1% (Sigma-Aldrich), pH 7,6) com adição de 3-5% de blocker (Bio-Rad). A etapa posterior foi a marcação com anticorpo primário. Para tanto foram utilizados os anticorpos, anti-COX-2 (Abcam:179800) na diluição 1:1000 e anti-GAPDH (Cell Signaling Technology) 1:10000, ambos diluídos em TBS-T 5% blocker. A marcação com anticorpo primário foi feita em um período overnight a 4°C sob agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas quatro vezes por 10 minutos em tampão TBS-T e, feito isso, seguiu-se para a marcação secundária com anticorpo anti-IgG de coelho 1:3000 (Abcam: 6721) por uma hora e trinta minutos. A revelação das membranas foi feita utilizando o kit ECL Plus Western blot detection reagents (GE HealthCare) e o equipamento ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD) conforme instruções dos fabricantes.

### **3.5.2.3 Análise funcional *in vitro* da propriedade imunomodulatória pelo ensaio de co-cultivo**

#### **3.5.2.3.1 Confecção da placa de co-cultivo**

No dia anterior ao início do ensaio, as UC-MSC foram plaqueadas em placa de 24 poços em triplicata de acordo com o seguinte gradiente celular: 1; 2,5; 5 e  $1 \times 10^4$  células/poço. O meio de cultivo para tanto foi  $\alpha$ -MEM 10% PHCS.

Para o isolamento de PBMC, foram coletados 50 mL de sangue periférico de um doador saudável, sexo masculino e idade de 32 anos (Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Processo HCRP 213/2018). O sangue coletado foi fracionado em tubos de fundo cônico de 50 mL (Greiner®) e sobre ele adicionou-se PBS 1X na proporção de 1:1. O sangue diluído foi então colocado sobre Ficoll Hypaque™ (GE Healthcare), mais uma vez na proporção de 1:1. O sistema de gradiente de densidade seguiu para a centrifugação a  $350 \times g$  por 30 minutos sem etapa de frenagem e conduzida à temperatura ambiente.

Ao fim da centrifugação, o anel de células brancas foi coletado utilizando pipeta pasteur. As células foram então centrifugadas ( $330 \times g$  por 10 minutos) por duas vezes com PBS 1X para lavagem. Depois disso, o botão de células foi ressuspensionado em 2-5 mL de PBS 1X e a densidade celular foi aferida.

Uma parte dos PBMC isolados foi ressuspensionados em meio RPMI 1640 10% soro fetal bovino (RPMI 10%SFB) a  $0,5 \times 10^6$  células/mL. Esta suspensão foi utilizada como controle negativo da etapa de marcação com Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Sigma Aldrich) e estimulação com fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Aldrich). O restante das células seguiu para a próxima etapa.

Para a marcação com CFSE utilizou-se a concentração final de 5  $\mu$ M. Para tanto, em um tubo de fundo cônico de 50 mL adicionou-se o a suspensão celular contendo o número PBMC desejado, CFSE estoque e completou-se o volume final de 5 mL com PBS 1X. A suspensão então foi incubada a 37°C por 20 minutos, sendo agitada vigorosamente a cada 5 minutos.

Em seguida, foi adicionado ao tubo, RPMI 10% SFB a proporção de 1:4 para interromper a marcação. Uma etapa adicional de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos foi feita para efluxo de excesso de corante. Posteriormente, centrifugou-se a  $330 \times g$  por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado, o botão de células ressuspensionado em meio RPMI 10% SFB e o número de células aferido. Uma suspensão de células marcadas a  $0,5 \times 10^6$  células/mL, foi reservada para atuar como controle negativo de estimulação por PHA (Sigma Aldrich). O restante seguiu para etapa de estimulação na qual em um tubo de fundo cônico de 50 mL foram adicionados o número de células e a quantidade de PHA para garantir, respectivamente, a densidade celular de  $0,5 \times 10^6$  células/mL e a concentração final de 1,5  $\mu$ g/mL de PHA.

Para o controle experimental dos PBMC, em uma placa de 24 poços plaqueou-se em triplicata 1 mL das seguintes suspensões celulares: PBMC não marcado e não estimulado; PBMC marcado, mas sem estimulação e por fim, PBMC marcado e estimulado com PHA.

Para a placa de co-cultivo prosseguiu-se da seguinte forma: o meio de cultura da placa de 24 poços contendo o gradiente de UC-MSc foi removido e sobre as células foi adicionado 1 mL de suspensão a  $0,5 \times 10^6$  células/mL de PBMC marcado e estimulado. Ambas as placas foram então incubadas por 5 dias em estufas a 37°C e atmosfera de 95% de misturas de gases e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.5.2.3.2 Análise do ensaio de contenção de proliferação de linfócitos**

Após 5 dias de co-cultivo os PBMC foram colhidos da placa controle e da placa co-cultivo. As células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 330 x g por 3 minutos. Sobre o botão de células obtidas foram adicionados 5 µL dos seguintes anticorpos (BD): anti-CD3 (APC), anti-CD4 (PE-Cy5) e anti-CD8 (PE). Após isso, as células foram incubadas ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, 2000 µL de PBS 1X foram utilizados para lavar o excesso de anticorpo e foi feita uma centrifugação a 330 x g por 3 minutos. O botão de células foi ressuscitado em 200 µL de PBS 1X e adquiridos no citômetro FACs DIVA (BD). Para a análise do ensaio de contenção de proliferação de linfócitos fez-se a comparação da percentagem de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> entre os grupos, controle positivo de proliferação e co-cultivos.

### **3.6 Triagem em larga escala por qPCR de moléculas reguladoras de expressão de COX-2**

#### **3.6.1 Tratamento das UC-MSC com os compostos da biblioteca e a extração de RNA**

Quatro dias antes do ensaio (dia 0), a linhagem UC-MSC 03 foi descongelada e cultivada em meio  $\alpha$ -MEM 10% PHCS para que atingissem cerca de 90% de confluência. Deste ponto em diante, as células foram colhidas enzimaticamente e plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5000 células/poço a um volume de 100  $\mu$ L de meio  $\alpha$ -MEM 10% PHCS.

No dia seguinte à confecção da placa, a placa de 384 poços contendo a biblioteca (placa mãe) foi descongelada e em seguida centrifugada 500xg por 1 minuto. Em seguida, 2  $\mu$ L de cada poço foi coletado e passado para uma segunda placa de 384 poços (placa de trabalho) e diluído em 64  $\mu$ L de PBS 1X. Cada composto da biblioteca tem a concentração de 10000  $\mu$ M e está totalmente diluído em DMSO 100%. Ao passar por esta diluição, cada composto apresentou-se a 300  $\mu$ M e DMSO 3% em uma solução com 66  $\mu$ L. Adicionalmente, os controles foram também preparados, sendo o controle positivo TNF- $\alpha$  a 600 ng/mL e negativo DMSO a 3%. Esta metodologia de preparo da biblioteca para triagem foi elaborada no artigo de dos Santos *et al.* (2020).

Posteriormente a etapa do preparo da placa de trabalho e das soluções controle, 20  $\mu$ L de cada composto foi adicionado ao seu respectivo poço na placa de cultura de 96 poços. O volume de 120  $\mu$ L resultante equivaleu a uma diluição de seis vezes. Desta forma, cada composto no tratamento apresentou a concentração de 50  $\mu$ M, tratamento TNF- $\alpha$  a 100 ng/mL e DMSO foi de 0,5%. O cultivo com os compostos foi feito por 72 horas.

Ao fim do ensaio o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS 1X. Em seguida, em cada poço adicionou-se 5  $\mu$ L de proteinase K a 10 mg/mL (Lóccus) e 100  $\mu$ L de PBS 1X. Com o auxílio da ponteira, as monocamadas foram raspadas e posteriormente todo o conteúdo do poço foi homogeneizado por pipetagem manual. O passo seguinte foi transferir o conteúdo de cada poço para a placa de etapa de lise e adicioná-la na extratora automatizada Extracta 96 (Lóccus).

O material genético obtido ao final do processo foi armazenado em freezer -80°C até o momento do uso.

### **3.6.2 Quantificação de RNA pelo método de curva padrão e síntese de cDNA**

Para quantificar o material genético obtido foi utilizado o *kit* GoTaq® Probe 1-step RT-qPCR system (Promega) que permite a transcrição e amplificação de RNA total em única reação. Para tanto, foram utilizados 5 µL de RNA total e a sonda de hidrólise para o gene endógeno GAPDH (Thermo Fisher Scientific - Hs99999905\_m1). O protocolo de reação e ciclagem foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. Os equipamentos utilizados foram o QuantStudio™ 5 e QuantStudio™ 6 and 7 flex (Thermo Fisher Scientific) e o método de análise de curva padrão.

Neste caso, utilizou-se uma amostra de RNA total da linhagem UC-MSK 03 de concentração conhecida como amostra padrão e desta foi feita curva de diluição seriada de fator 2. Os pontos abordados foram de 100 a 3,1 ng/mL RNA total e com base na curva o equipamento calculava automática a concentração de cada amostra. A análise dos dados foi feita com o *software* Design and Analysis 2.6 para windows 10 (Thermo Fisher Scientific). As amostras quantificadas com concentração menor que 7 ng/µL foram excluídas da síntese de cDNA. Os tratamentos acima desta concentração seguiram à para reação.

Para a transcrição reversa o *input* de RNA total foi de 100 ng e o kit utilizado foi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.6.3 Avaliação de eficiência das sondas de hidrólise**

Dispondo do cDNA de todos os tratamentos o passo seguinte foi estabelecer a eficiência das sondas de hidrólise para seleção por qPCR. Foram utilizados nesta etapa as sondas de hidrólise para COX-2 (gene alvo - Hs00153133\_m1 (Thermo Fisher Scientific) e B2M (gene endógeno - Hs00187842\_m1) e o cDNA de 100 ng de RNA total de UC-MSK 03 tratadas com TNF-α. Primeiramente, o material genético foi diluído de forma seriada. Foram feitas duas curvas, uma de fator 2 (100 a 3,1 ng de cDNA) e outra de fator 5 (100 a 0,032 ng de cDNA). A amplificação das curvas foi feita de acordo com as instruções do fabricante do produto TaqMan™ Universal PCR

Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e utilizando o equipamento QuantStudio™ 6 and 7 flex (Thermo Fisher Scientific) no método de análise de curva padrão. A análise dos dados foi feita com o *software* Design and Analysis 2.6 para windows 10 (Thermo Fisher Scientific). Com base nos resultados obtidos nesta etapa a determinou-se a melhor diluição para o cDNA e o *cycle threshold* para as análises.

### 3.6.4 Triagem em larga escala por qPCR

#### 3.6.4.1 Triagem primária

Para triagem em larga escala por qPCR o cDNA de cada tratamento foi primeiramente diluído 5 vezes. Para a reação foram utilizados 2 µL de cDNA 1:5, 5µL Taqman™ Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL sonda de hidrólise Taqman™ (Life Technologies) e 2,5 µL H2O Nuclease-free (MerckMillipore). A reação foi amplificada no equipamento QuantStudio™ 6 and 7 flex (Thermo Fisher Scientific) com etapas de ciclagem de acordo como o descrito pelo fabricante. As sondas utilizadas foram COX-2 (gene alvo - Hs00153133\_m1 (Thermo Fisher Scientific)) e B2M (gene endógeno - Hs00187842\_m1). Os dados foram avaliados pelo método de *Comparative ΔΔCT* na fórmula

Fórmula 1 – Comparative ΔΔCT

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Na qual primeiramente é feita a diferença entre o ciclo de amplificação do gene alvo e gene de referência ( $\Delta$ ) para cada amostra. Em seguida, este valor é normalizado pelo valor de  $\Delta$  da amostra calibradora que nada mais é que a UC-MSD tratada somente com meio de cultura. O valor normalizado  $\Delta\Delta CT$  é então utilizado na fórmula que determina o acréscimo ou decréscimo da expressão gênica de interesse.

Com base na análise do cDNA obtido das placas de condições controle dos ensaios NIH1 e NIH2 e sugestões da literatura (BITTKER, 2012; YANG *et al.*, 2016) foram estabelecidos os critérios de seleção da triagem primária:

1. Foram selecionadas moléculas que aumentaram a expressão do gene COX-2 em mais de 2,2 vezes (média de modulação positiva de COX-2 mais 3 desvios);

2. As moléculas selecionadas deveriam apresentar o ciclo de amplificação para o gene endógeno até 21 (média do ciclo de amplificação do gene endógeno entre as amostras selecionadas mais um desvio);

#### **3.6.4.2 Triagem secundária**

Para a triagem secundária de drogas, as células foram tratadas novamente com as moléculas selecionadas e os controles. A extração de RNA, quantificação por curva padrão e reação de qPCR foram realizadas conforme a descrição acima. Como critérios de seleção optamos por:

1. Foram selecionadas moléculas que aumentaram a expressão do gene COX-2 em mais de 2,0 vezes (média de modulação positiva de COX-2 mais 3 desvios)
2. As moléculas selecionadas deveriam apresentar o ciclo de amplificação para o gene endógeno até 21,5 (média do ciclo de amplificação do gene endógeno entre as amostras selecionadas mais um desvio);

### **3.7 Caracterização de moléculas selecionadas na triagem em larga escala**

#### **3.7.1 Validação da molécula selecionada por qPCR e Western Blot**

As células foram plaqueadas em duas placas de 48 poços (Greiner® bio-one) a uma densidade celular de 18.000 células/poço usando 400 µL de α-MEM PHCS 10%. Após 24 horas, o meio foi removido e substituído por 400 µL de meio α-MEM 10% PHCS suplementado com diferentes concentrações da molécula a ser avaliada. As soluções foram preparadas em α-MEM 10% PHCS 0,25% DMSO em diluição seriada 1:2 (50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,6 e 0,8 µM).

Cada concentração foi adicionada à placa em sextuplicata. Nas condições de controle, as células foram tratadas com α-MEM 10% PHCS 0,25% DMSO ou somente com α-MEM 10% PHCS, ambas em triplicata. Todas as condições foram cultivadas por 72 horas. Em seguida, alíquotas do meio condicionado de cada tratamento foram coletadas e armazenadas em -80°C até o momento do uso. Neste caso, as amostras coletadas foram direcionadas para futura quantificação de PGE2. Adicionalmente, a sextuplicata de cada concentração em cada placa foi utilizada para coleta de proteínas para análise por WB e a outra para extração de RNA total. O preparo de amostra para o WB foi feito de acordo com o descrito no item **3.5.2.2** e para o RNA como descrito no item **3.5.1.2**.

### **3.8 Padronização de análise funcional *in vitro* e modelo animal murino para GvHD**

#### **3.8.1 Ensaio de imunomodulação para análise funcional *in vitro***

Esta abordagem foi baseada no trabalho de Yang et al. 2018 com modificações. Em uma placa de 24 poços, as UC-MSC foram plaqueadas em quintuplicatas a  $1 \times 10^5$  células/poço. Após um período de 24 horas de plaqueamento, o meio de cultura  $\alpha$ -MEM 10% foi removido e adicionou-se sobre as células  $\alpha$ -MEM PHCS 10% suplementado com 10  $\mu$ g/mL de mitomicina C (Sigma-Aldrich). O tratamento foi feito por 2 horas e ao fim o meio foi retirado e a monocamada lavada duas vezes com PBS 1X. Sobre as monocamadas pré-tratadas com mitomicina C foram adicionados os tratamentos:  $\alpha$ -MEM 10% foi suplementado com 50  $\mu$ M de molécula selecionada,  $\alpha$ -MEM PHCS 10% suplementado com DMSO a 0,25% e somente  $\alpha$ -MEM PHCS 10%.

Após 72 horas de cultivo, em paralelo, 50 mL de sangue periférico humano foi coletado. O PBMC foi isolado, marcado com CFSE e estimulado com PHA conforme a descrição do item **3.5.3.2.1**. A suspensão de PBMC preparada seguiu então para o co-cultivo. Para tanto, primeiramente, os tratamentos foram removidos da placa contendo as UC-MSC e os poços foram lavados em PBS 1X. Feito esta etapa, foi adicionado sobre as monocamadas o PBMC marcado e estimulado a densidade celular de  $0,5 \times 10^6$  células/mL. O co-cultivo foi feito por 144 horas e posteriormente o PBMC foi colhido para análise de citometria conforme o item **3.5.2.3.2**.

#### **3.8.2 Modelo animal murino para GvHD**

##### **3.8.2.1 Camundongos imunodeficientes**

Este modelo foi baseado na publicação de (JANG *et al.* 2014) com modificações. Assim como os autores, utilizou-se camundongos imunodeficientes NOD.Cg-PkrdcsidIL2rgtmIWjl/Szj (NSG). Para os nossos experimentos, foram usados animais de ambos os sexos com 8 a 14 semanas de idade.

##### **3.8.2.2 Distribuição dos animais em grupos**

De acordo com os experimentos, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- **Controle (CTRL):** Animais sem condicionamento por irradiação e sem infusão de PBMC humano.
- **Controle Irradiado (IRR CTRL):** Animais condicionados por irradiação e sem infusão de PBMC humano.
- **Controle Irradiado mais lavado medular (IRR CTRL + MO):** Animais irradiados e posteriormente infundidos com lavado medular murino.
- **Irradiado (IRR):** Animais condicionados com irradiação e infundidos com PBMC.

### **3.8.2.3 Etapa de condicionamento por irradiação de corpo total e xenotransplante de PBMC humano**

Para o condicionamento, primeiramente, os animais foram irradiados. No processo, os animais foram submetidos a irradiação de corpo total com raio-X com dose de 2 Gy. Após 24 horas, os animais seguiram para etapa de xenotransplante.

Primeiramente, o PBMC humano (doador saudável do sexo masculino com 32 anos) foi isolado em PBS 1X conforme descrito no item **3.5.2.3.1**. Os animais foram então anestesiados via inalatória com atmosfera composta de isoflorano 4% (Cristália) e 96% O<sub>2</sub> (Cristália) e em seguida receberam a infusão de 100 µL de PBMC no plexo retro-orbital direito. O número de células infundidos avaliado ao longo dos experimentos foi de 1 e 2,5x10<sup>6</sup> células.

### **3.8.2.4 Avaliação da influência do lavador no condicionamento por irradiação de corpo total**

Os animais foram irradiados com dose de 2 Gy e no dia seguinte receberam a infusão de lavado medular. Para tanto, um animal não irradiado foi eutanasiado com sobredose anestésica de TBE (1 mg/g de animal) e seu fêmur coletado. Utilizando uma seringa de 1 mL com comprimento de 8 mm e agulha acoplada com calibre de

0,3 mm (BD) foi feito um jato com PBS 1X na cavidade medular e a suspensão celular obtida teve sua densidade celular aferida e reservada até o momento do uso.

Para a infusão de lavado medular murino, os animais irradiados foram previamente anestesiados por via inalatória e em seguida recebiam 100  $\mu$ L de lavado medular ( $0,25 \times 10^6$  células) no plexo retro-orbital direito.

### **3.8.2.5 Análise do desenvolvimento de GvHD**

#### **3.8.2.5.1 Análise comportamental**

Após o xenotransplante, animais foram acompanhados diariamente e analisados a cada 48 horas de acordo com os seguintes parâmetros: sobrevivência, perda de peso (perda de 1-10% do peso original – pontuação 0; perda de 11 a 25% – pontuação 1; perda de mais 25% – pontuação 2), postura, atividade física, integridade da pele, e aparência do pelo (normal – pontuação 0, levemente anormal – pontuação 1 e anormal – pontuação 2). O objetivo desta análise foi definir o período e a intensidade do GvHD no modelo animal.

#### **3.8.2.5.2 Monitoramento de linfócitos humanos nos animais xenotransplantados**

No período de 12 e 15 dias após o xenotransplante um animal de cada grupo foi eutanasiado com sobredose de anestésico TBE via intraperitoneal (0,8 mL/20 g). Logo em seguida ao procedimento, foi feita punção cardíaca de 400-500  $\mu$ L de sangue total e observação dos órgãos. O sangue total coletado foi centrifugado a 1300 x g por 10 minutos e o plasma armazenado em -80°C para futuras análises de citocina inflamatórias. O botão de células, primeiramente, foi ressuscitado em 2 mL tampão de lise (BD) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X a 300 x g por 5 minutos e incubadas por 30 minutos a 8°C ao abrigo da luz com anticorpos anti-CD45 murino (BD), anti-CD3 humano (BD) e anti-CD45 humano (BD). Depois da marcação, as células foram lavadas com PBS 1X a 300 x g por 5 minutos, ressuscitadas em 300  $\mu$ L de PBS 1X e adquiridas no citômetro LSR Fortessa (BD).

### **3.9 Análise Estatística**

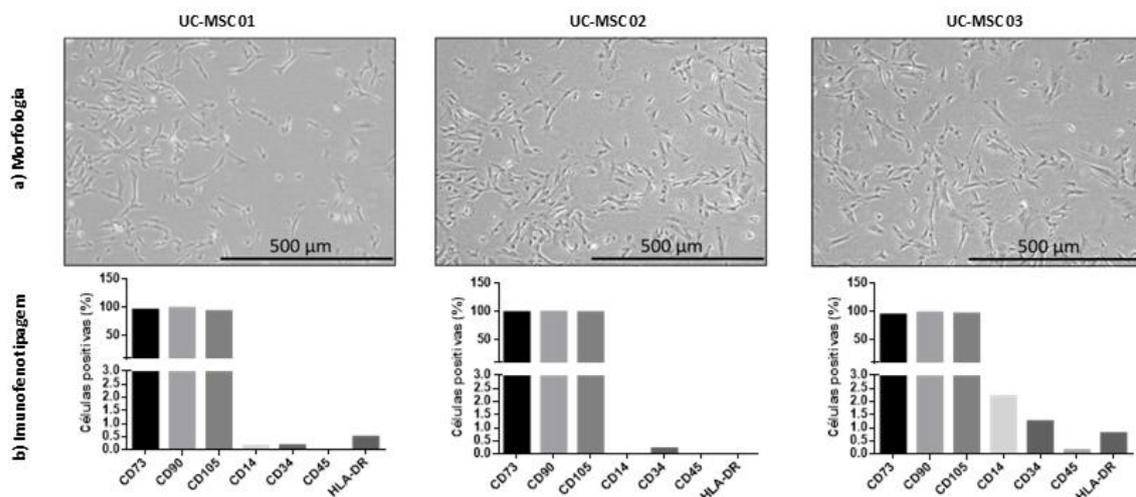
A comparação entre médias de dois grupos foi feita com teste de Mann-Whitney. Para três ou mais grupos, Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. O nível de significância ( $\alpha$ ) foi de 5%. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 6.

## 4. Resultados

### 4.1 As células isoladas do cordão umbilical cultivadas com PHCS são caracterizadas como células estromais mesenquimais multipotentes

A partir da passagem 3, cada população celular foi caracterizada de acordo com os critérios da ISCT (DOMINICI *et al.*, 2006). As análises, morfológica e imunofenotípica, demonstraram que as 3 linhagens primárias foram células aderentes ao plástico com morfologia fibroblastoide (Figura 1a) e com maioria (>95%) positiva para os marcadores CD73, CD90 e CD105 (Figura 1b). Para os marcadores CD14, CD34, CD45 e HLA-DR, foram encontradas no máximo 2,5% de células positivas e, portanto, foram considerados ausentes (Figura 1b).

Figura 1- Morfologia e perfil imunofenotípico.

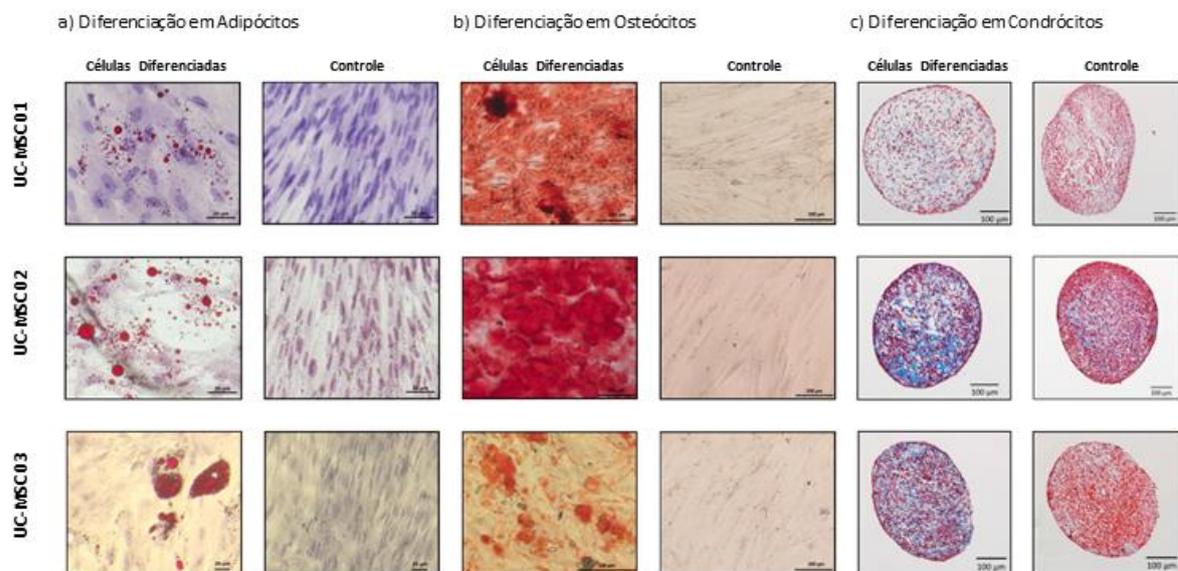


As três linhagens de células estromais mesenquimais multipotentes do cordão umbilical (UC-MSC) foram caracterizadas quanto a (a) morfologia por microscopia de contraste de fase (aumento de 4X) e (b) o perfil imunofenotípico baseado na porcentagem de células positivas (eixo y) por marcadores de superfície (eixo x). Fonte: Material do autor.

O ensaio de diferenciação *in vitro* para linhagens mesodérmicas demonstrou que as três linhagens se diferenciaram em adipócitos, osteócitos e condrócitos. A diferenciação em adipócitos ocorreu em média de 20 dias. Neste caso, as células adquiriram uma morfologia mais arredondada e acumularam vesículas lipídicas em comparação ao controle (Figura 2a). A morfologia foi evidenciada pela coloração de Hematoxilina de Harris e as vesículas pelo corante *Oil Red O*.

A diferenciação em osteócitos ocorreu em média 30 dias após o ensaio. Neste caso, as células apresentaram um núcleo maior e acumularam cristais de oxalato de cálcio (corado em vermelho pelo corante *Alizarin Red S*) (Figura 2b). O ensaio de diferenciação em condrócitos também ocorreu em 30 dias. A secção dos aglomerados tridimensionais foi corada com Tricoma de Masson que mostra células coradas em vermelho e colágeno em azul. Observou-se que os aglomerados tridimensionais cultivados no ensaio de diferenciação apresentaram acúmulo de colágeno entre as células em comparação com o controle (Figura 2c).

Figura 2 – Capacidade de diferenciação mesodérmica em células estromais mesenquimais do cordão umbilical.



As três linhagens de células estromais mesenquimais multipotentes do cordão umbilical (UC-MSC) foram caracterizadas quanto a capacidade de diferenciar em (a) adipócitos, (b) osteócitos e (c) condrócitos. Em cada item são apresentadas imagens obtidas por microscopia de campo claro nas condições de células diferenciadas e não diferenciadas (controle). Fonte: Material do Autor.

Os resultados em conjunto demonstraram que as linhagens celulares isoladas são células estromais mesenquimais multipotentes. Deste ponto em diante, as linhagens foram denominadas UC-MSC e sua numeração representa a ordem em que foram isoladas.

## **4.2 A UC-MSC selecionada para a triagem em larga escala apresenta aumento na expressão de ciclo-oxigenase 2 mediante tratamento com citocina inflamatória TNF- $\alpha$ e é uma imunomoduladora funcional**

Uma vez caracterizadas as linhagens de UC-MSC, o passo seguinte foi a seleção da amostra que seguiria para a triagem. O processo levou em consideração a expressão de COX-2 frente ao tratamento com TNF- $\alpha$ . A primeira análise foi a de qPCR, conduzida após dois períodos de tratamento com a citocina inflamatória: 24 e 72 horas. Após 24 horas, observou-se que as amostras UC-MSC 01-03 demonstraram aumento nas unidades relativas de expressão (URE) do mRNA de COX-2 quando tratadas com TNF- $\alpha$  em comparação ao DMSO 0,5% (Figura 3a-c). Na linhagem UC-MSC 01, este aumento foi de cerca de duas vezes (URE média: TNF- $\alpha$  =  $134,6 \pm 3,5$ ; DMSO 0,5% =  $76,1 \pm 1,7$ ). Já nas amostras 02 e 03, cerca de 3 vezes maior (UC-MSC 02 URE média: TNF- $\alpha$  =  $188,81 \pm 66,1$ ; UC-MSC 02 DMSO 0,5% =  $58,1 \pm 15,1$ ) (UC-MSC 03 URE média: TNF- $\alpha$  =  $963,9 \pm 169,3$ ; UC-MSC 03 DMSO 0,5% =  $353,8 \pm 32$ ).

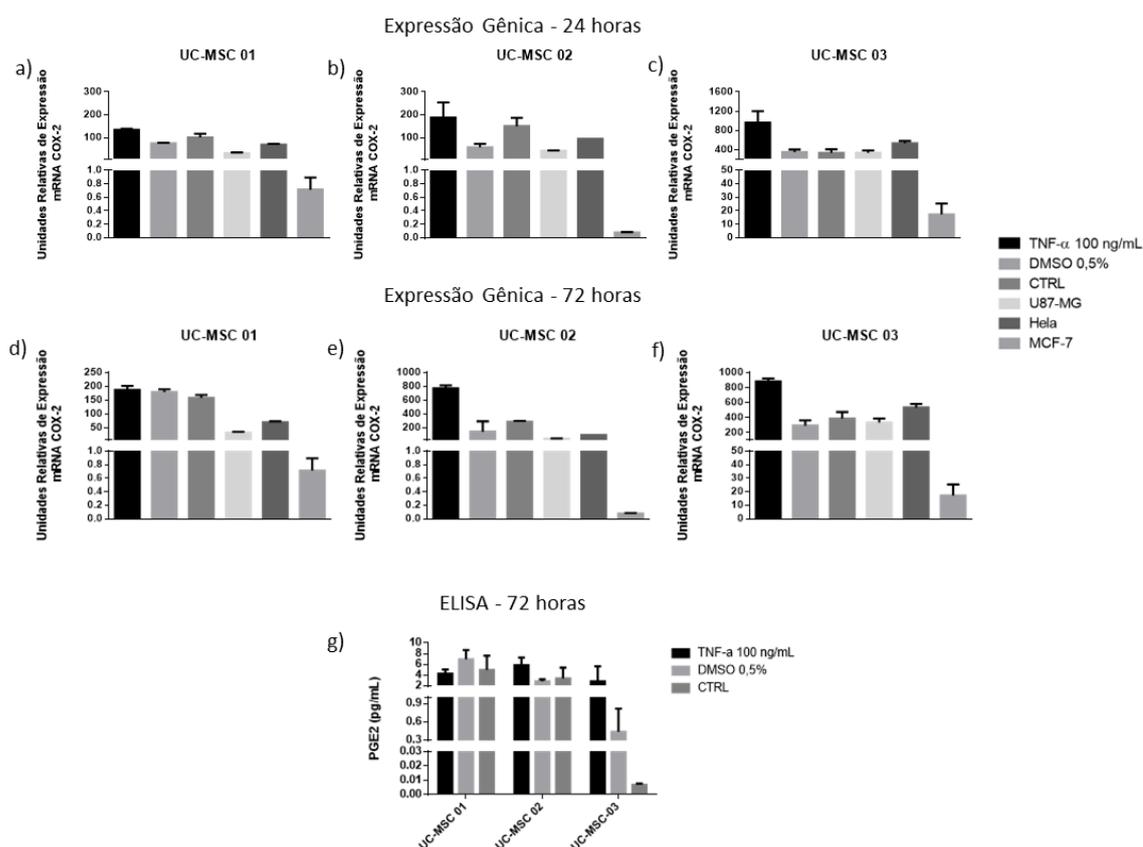
Após 72 horas, observou-se que as amostras UC-MSC 02 e 03 apresentaram aumento de 5 e 3 vezes na expressão de COX-2, respectivamente (URE média: TNF- $\alpha$  =  $770,2 \pm 31,2$ ; DMSO 0,5% =  $142,7 \pm 105,9$  e URE média: TNF- $\alpha$  =  $883,2 \pm 27,5$ ; DMSO 0,5% =  $293,7 \pm 49,9$ ). Contudo, as URE de COX-2 observadas na amostra UC-MSC 01 tratada com TNF- $\alpha$  foram próximas às observadas na condição DMSO 0,5% (URE média: TNF- $\alpha$  =  $186,6,2 \pm 14,6$ ; DMSO 0,5% =  $179,06 \pm 9,6$ ) (Figura 3d-f). Vale ressaltar que, em nenhum dos períodos avaliados, a condição DMSO 0,5% demonstrou valor URE médio maior que a condição CTRL nas três linhagens. Para fins de comparação, foram utilizadas linhagens controle para amplificação de COX-2. HeLa e U87-MG são linhagens controle positivo e MCF-7 controle negativo.

Em paralelo à coleta de material genético, foi feita a coleta do sobrenadante condicionado pelas células. Este material foi analisado pela técnica de ELISA para quantificação de PGE<sub>2</sub>, produto da ação enzimática de COX-2 sobre o ácido araquidônico.

A quantificação de PGE<sub>2</sub> após 72 horas corrobora a expressão gênica observada nas amostras UC-MSC 02 e UC-MSC 03 (Figura 3g). No meio condicionado por UC-MSC 02 tratadas com TNF- $\alpha$ , a concentração de PGE<sub>2</sub> é duas vezes maior que no tratamento com DMSO 0,5% ([PGE<sub>2</sub>] média: TNF- $\alpha$  =  $5,85 \pm 1,01$  pg/mL; DMSO 0,5% =  $2,87 \pm 0,25$  pg/mL). Para UC-MSC 03, a diferença é de cerca de

seis vezes e meia ([PGE2] média: TNF- $\alpha$  = 2,87 $\pm$ 1,96 pg/mL; DMSO 0,5% = 0,44 $\pm$ 0,27 pg/mL). Ao contrário, na amostra UC-MSC 01, os dados indicam que há maior concentração de PGE2 no grupo DMSO 0,5% do que na condição TNF- $\alpha$  e CTRL ([PGE2] DMSO 0,5% média = 6,97 $\pm$ 1,2 pg/mL; [PGE2] média: TNF- $\alpha$  = 4,27 $\pm$ 0,56 pg/mL e CTRL = 4,99 $\pm$ 1,87 pg/mL).

Figura 3 – Análise de qPCR para expressão de mRNA de COX-2 e quantificação de PGE2 por ELISA



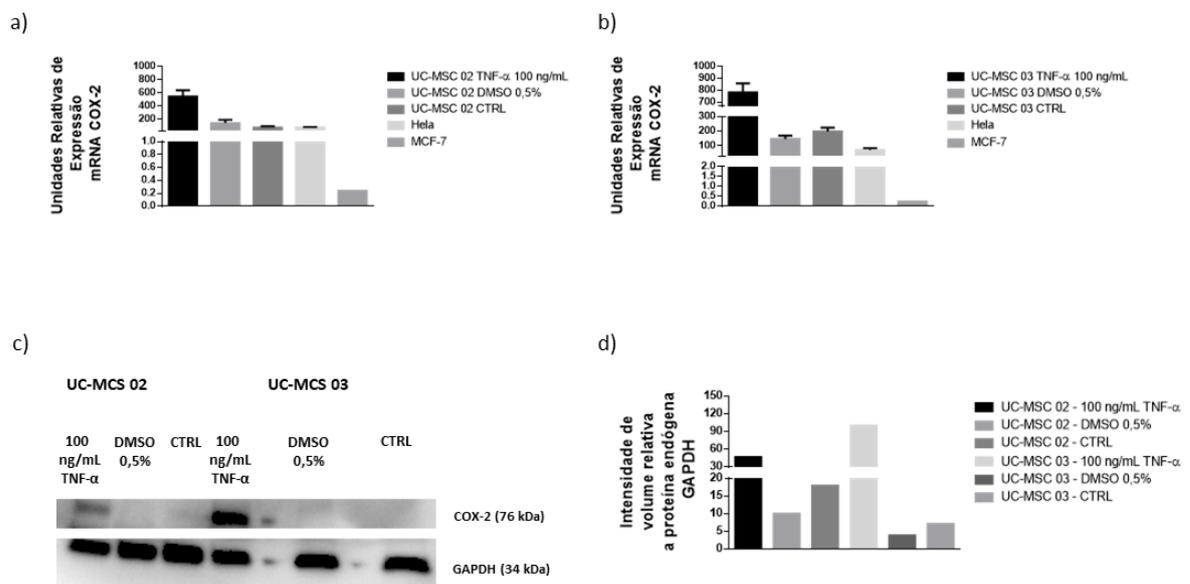
Unidades Relativas de Expressão (URE) do mRNA de COX-2 nas linhagens UC-MSC 01, UC-MSC 02, UC-MSC 03, U87-MG, HeLa e MCF-7. As linhagens UC-MSC foram submetidas por 24 (a-c) e 72 (d-f) horas às seguintes condições de tratamento: TNF- $\alpha$  a 100 ng/mL, DMSO 0,5% e Controle (CTRL). As linhagens U87-MG e HeLa são controle positivo para expressão de COX-2 e a linhagem MCF-7, controle negativo. As barras indicam a URE média para COX-2  $\pm$  desvio padrão médio entre as duplicatas. (g) Após 72 horas, a molécula PGE2 foi quantificada no sobrenadante de cada condição de tratamento. As barras indicam a concentração média de PGE2 em pg/mL  $\pm$  desvio padrão médio entre as duplicatas. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn considerando  $\alpha = 0,05$ .  $p > 0,05$  (não significativa). Fonte: Material do Autor.

Para a validação dos dados, um segundo experimento foi feito utilizando somente as amostras UC-MSC 02 e 03 no período de 72 horas. Para tanto, usou-se a análise da expressão gênica e proteica, avaliadas por qPCR e *western blot* (WB). As URE de COX-2 em UC-MSC 02 tratada com TNF- $\alpha$  após 72 horas é cerca de 4

vezes maior que em relação ao tratamento com DMSO 0,5% (URE média: TNF- $\alpha$  = 547,5 $\pm$ 65,5; DMSO 0,5% = 143,1 $\pm$ 34,1) (Figura 4a). No caso da UC-MSC 03 (figura 4b), o incremento nas URE de COX-2 foi de 5,3 vezes (URE média: TNF- $\alpha$  = 783,02 $\pm$ 53,2; DMSO 0,5% = 148,5 $\pm$ 15,6).

Na dosagem proteica por WB (Figura 4c), foram observadas bandas de COX-2 com maior intensidade na linhagem UC-MSC 03 após 72 horas de tratamento com TNF- $\alpha$  a 100 ng/mL. Para análise quantitativa destes dados, a intensidade das bandas foi mensurada pelo *software* Image Lab v.5, onde foi possível observar que a UC-MSC 03 apresenta uma banda com volume intensidade relativa (VIR) duas vezes maior que a UC-MSC 02 (UC-MSC 02 46,7 VIR; UC-MSC 03 99,9 VIR) (Figura 4d).

Figura 4 – Análise por qPCR e WB da modulação da expressão de COX-2.



Unidades Relativas de Expressão (URE) do mRNA de COX-2 nas linhagens UC-MSC 02 (a) e UC-MSC 03 (b) após 72 horas das condições de tratamento: TNF- $\alpha$  a 100 ng/mL, DMSO 0,5% e Controle (CTRL). As linhagens HeLa e MCF-7 são, respectivamente, controle positivo e negativo para expressão gênica de COX-2. As barras indicam a URE média para COX-2  $\pm$  desvio padrão médio entre as duplicatas. As proteínas de cada linhagem e tratamento foram extraídas e analisadas por Western Blot (WB) (c). No WB observa-se a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2, 76 kDa) nas linhagens em resposta às condições de tratamento. Como controle endógeno, usou-se a proteína GAPDH. No item d, o resultado da quantificação da intensidade do volume das bandas de COX-2 em cada tratamento normalizado pela intensidade das bandas da proteína endógena GAPDH. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn considerando  $\alpha$  = 0,05.  $p > 0,05$  (não significante). Fonte: Material do autor.

Notou-se que, nas replicatas experimentais de qPCR, houve divergência sobre qual das duas linhagens teria a maior expressão gênica de COX-2 (Figura 3e-f, Figura 4a-b). No entanto, considerou-se que nas técnicas de ELISA e WB o alvo é a proteína

COX-2, e em ambas a UC-MSc 03 demonstrou melhores resultados. Logo, escolheu-se a UC-MSc 03 como a linhagem que melhor respondeu ao tratamento e, portanto, ela seria usada no processo de triagem.

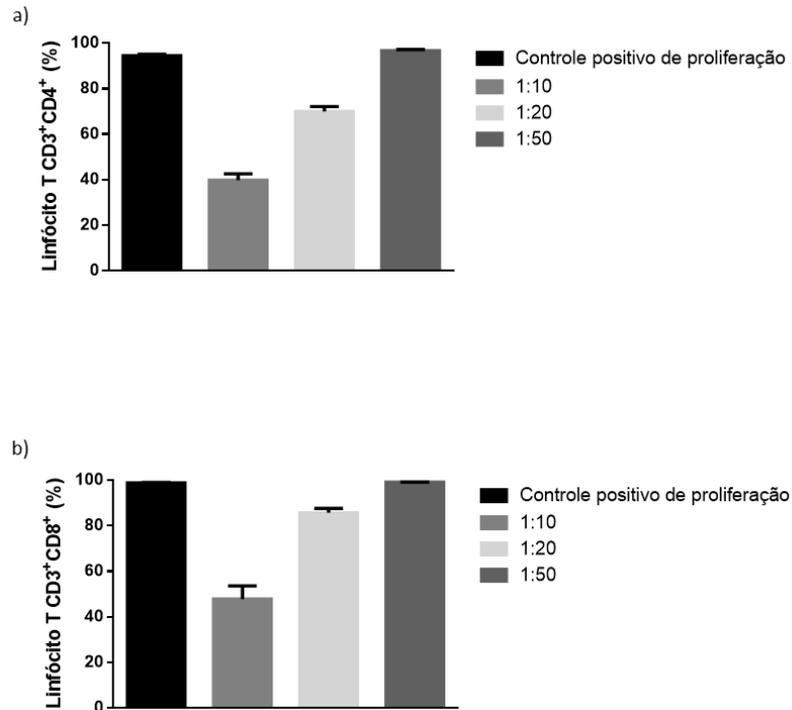
Após a seleção da linhagem para a triagem em larga escala de compostos sintéticos, foi avaliada também a sua funcionalidade *in vitro* como imunomoduladora. Para tanto, foi feito o ensaio de co-cultivo com PBMC com ênfase em linfócitos TCD4+ e TCD8+, estimuladas com mitógeno fitohemaglutinina (do inglês *phytohemagglutinin*, PHA), nas seguintes condições: 1 MSC para 10 PBMC (1:10), 1 MSC para 20 PBMC (1:20) e 1 MSC para 50 PBMC (1:50). Nestes experimentos, a proliferação observada mediante tratamento com PHA sem a presença de MSC foi considerada como a condição controle.

Os linfócitos TCD4+ cocultivados com a linhagem UC-MSc 03 a 1:10 apresentaram queda na proliferação de cerca de 2,4 vezes quando comparados àqueles tratados com PHA (% média: controle =  $94,5 \pm 0,5\%$ ; 1:10 =  $39,8 \pm 2,0\%$ ). Para a condição 1:20, cerca de 1,35 vezes (% média: controle =  $94,5 \pm 0,5\%$ ; 1:20 =  $70,0 \pm 1,4\%$ ) e ausência de contenção em 1:50 (% média: controle =  $94,5 \pm 0,5\%$ ; 1:50 =  $96,7 \pm 0,4\%$ ) (Figura 5a).

Para os linfócitos T CD8+, a queda de proliferação durante o co-cultivo é de 2,0 vezes em 1:10 (% média: controle =  $98,9 \pm 0,1\%$ ; 1:10 =  $47,8 \pm 4,4\%$ ), 1,1 vezes em 1:20 (% média: controle =  $98,9 \pm 0,1\%$ ; 1:20 =  $85,7 \pm 1,5\%$ ) e ausente 1:50 (% média: controle =  $98,9 \pm 0,1\%$ ; 1:50 =  $99,1 \pm 0,04\%$ ) (Figura 5b).

Logo, de acordo com estes resultados, a UC-MSc 03 apresentou-se como imunomoduladora funcional nas proporções de 1:10 e 1:20 de forma dose dependente.

Figura 5 – Ensaio de co-cultivo.



A UC-MS3 03 foi co-cultivada com PBMC estimulados com mitógeno em três proporções (MSC:PBMC): 1:10; 1:20 e 1:50. O gráfico indica a porcentagem média  $\pm$  desvio padrão amostral de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (a) T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (b) nas condições de controle positivo de proliferação e nas três proporções de co-cultivo. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn considerando  $\alpha = 0,05$ .  $p > 0,05$  (não significativa). Fonte: Material do Autor.

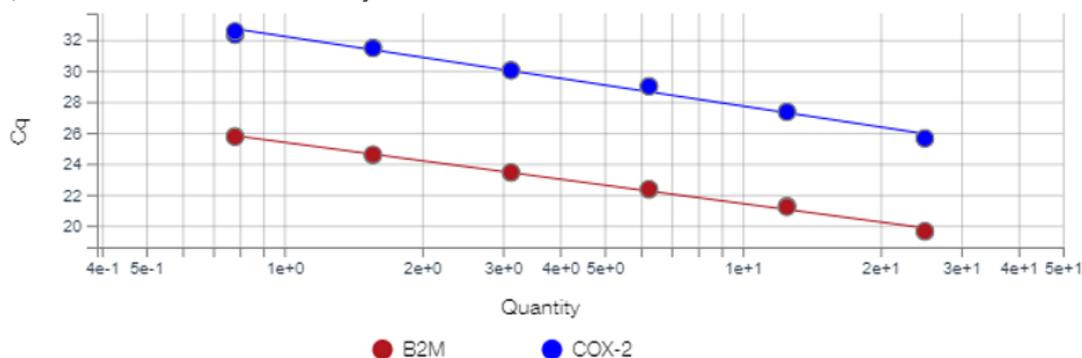
### 4.3 A estratégia de modulação de COX-2 por TNF- $\alpha$ pode ser avaliada por qPCR no método de $\Delta\Delta CT$

Estabelecido a estratégia de modulação de COX-2 e selecionada linhagem adequada para a triagem, o próximo passo foi padronizar a análise por qPCR. Para tanto, foi utilizado o cDNA sintetizado conforme a descrição dos itens 3.6.1 e 3.6.2. O método de análise escolhido foi o *Comparative CT* ( $\Delta\Delta CT$ ), que determina o acréscimo ou decréscimo da expressão gênica de um alvo em relação a um gene endógeno de referência. Este método exige que as sondas de hidrólise para o gene alvo e o endógeno apresentem eficiência similar. A forma de averiguar isso é utilizando as análises de curva padrão no equipamento de qPCR.

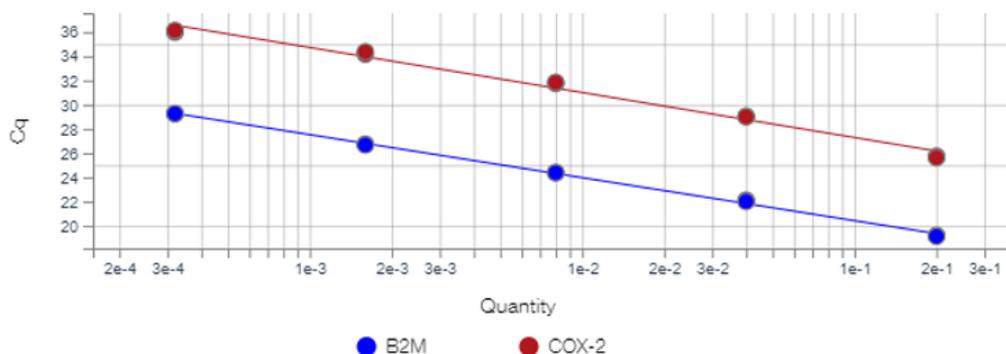
Baseado em experimentos anteriores (dados não mostrados), determinou-se que o conjunto gene endógeno e gene alvo seria, respectivamente, B2M (Hs00187842\_m1) e COX-2 (Hs00153133\_m1). Foram construídas duas curvas padrão de 5 pontos, com fator de diluição 2 e 5, a partir do cDNA de UC-MSK 03 tratadas com TNF- $\alpha$ . A eficiência de cada sonda foi determinada para cada fator de diluição, no *cycle threshold* de 0,04. Observou-se que, na curva de fator de diluição 2, a eficiência de ambas as sondas é abaixo de 80% (B2M: 79% e COX-2: 67%). Além disso, o parâmetro de inclinação da reta (*slope*) indica que as sondas apresentam inclinações diferentes (*slope* B2M: -4,5 e *slope* COX-2: -3,9) (Figura 6a). Ao contrário, no fator de diluição 5, a eficiência é próxima de 90% para ambas (B2M: 91% e COX-2: 86%) e a inclinação da reta é similar (*slope* B2M: -3,7 e *slope* COX-2: -3,5) (Figura 6b). Desse modo, o fator de diluição determinado para a análise de  $\Delta\Delta CT$  foi de 1:5.

Figura 6 – Curvas de eficiência das sondas de hidrólise B2M e COX-2.

a) Curva de eficiência fator de diluição 2

Target: COX-2 Slop: -4.503 R<sup>2</sup>: 0.99 Y-Inter: 32.227 Eff%: 66.76 Error: 0.143Target: B2M Slop: -3.959 R<sup>2</sup>: 0.996 Y-Inter: 25.381 Eff%: 78.89 Error: 0.083

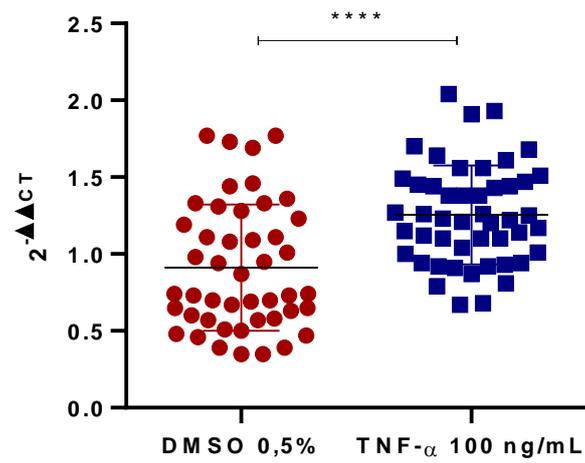
b) Curva de eficiência fator de diluição 5

Target: COX-2 Slop: -3.72 R<sup>2</sup>: 0.987 Y-Inter: 23.567 Eff%: 85.706 Error: 0.148Target: B2M Slop: -3.556 R<sup>2</sup>: 0.998 Y-Inter: 16.856 Eff%: 91.08 Error: 0.051

Curvas de eficiência de fator de diluição 2 (a) e 5 (b) para as sondas de hidrólise. O gráfico apresenta o Ciclo de Quantificação (Cq) em função do logaritmo da massa de cDNA (*quantity*). Os valores de eficiência (Eff%) e inclinação da curva (slop) estão localizados embaixo de cada gráfico. Fonte: Material do autor.

Em seguida, foi avaliada a capacidade de distinção entre tratamentos com efeito (TNF- $\alpha$ ) e sem efeito (DMSO 0,5%) nas condições estabelecidas acima. Para isso, foi feita uma reação de qPCR utilizando o cDNA obtido de tratamentos com TNF- $\alpha$ , DMSO 0,5% e CTRL. Os resultados indicaram que houve diferença significativa na expressão de COX-2 entre o tratamento com citocina inflamatória e DMSO 0,5% ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  TNF $\alpha$  =  $1,25 \pm 0,32$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT}$  DMSO 0,5% =  $0,91 \pm 0,41$ ) (Figura 7). No entanto, há sobreposições de valores entre os tratamentos com efeito e sem efeito, o que afeta a sensibilidade do teste. Ainda assim, é possível discriminar entre os tratamentos com as análises qPCR estabelecidas.

Figura 7 – Análise de qPCR para as condições controle.

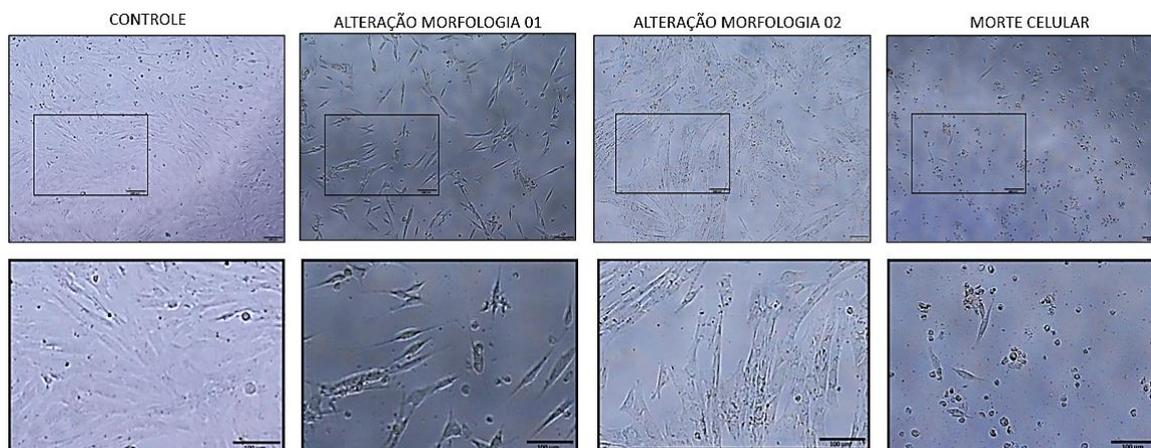


O gráfico mostra a expressão gênica média ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de COX-2 nos tratamentos com citocina inflamatória TNF- $\alpha$  e DMSO 0,5%. A análise estatística dos dados foi feita com teste não paramétrico de Mann-Whitney considerando  $\alpha = 0,05$ .  $p < 0,001$  (\*\*\*). Fonte: Material do autor.

#### 4.4 As triagens primária e secundária elegeram o produto natural indirubina como molécula moduladora de COX-2

A fim de avaliar a influência dos compostos provenientes das placas NIH 1-3 na viabilidade da monocamada de células, os poços foram avaliados individualmente por microscopia de contraste de fase após 72 horas de tratamento. Foram identificados alguns compostos que demonstraram citotoxicidade sobre as UC-MSC, como alterações morfológicas e morte celular (Figura 8 e Apêndice C). No ensaio da placa NIH 1, observou-se que, dos 320 compostos testados, 23 causaram alterações de morfologia e/ou viabilidade das células. Para NIH 2, esta contagem chegou a 28, e para NIH 3, 9 compostos. Os poços afetados foram excluídos do processo de extração de RNA. Ao todo, 647 tratamentos prosseguiram para a próxima etapa.

Figura 8 – Alterações decorrentes do tratamento com compostos citotóxicos.



A imagem mostra as alterações morfológicas e de morte celular nas culturas tratadas com alguns compostos em relação ao controle. Fonte: Material do autor.

A concentração média de RNA em relação a todos os ensaios foi de  $11,1 \pm 4,2$  ng/ $\mu$ L. Com base neste resultado, optou-se por normalizar a massa de RNA total para síntese de cDNA em 100 ng. Conseqüentemente, as amostras com concentração abaixo de 7 ng/ $\mu$ L foram excluídas. Desta forma, seguiram para a síntese de cDNA o material de 590 tratamentos. Com base nos critérios estabelecidos no item 3.6.4.1, foram selecionadas 53 moléculas candidatas (Figura 09 e Tabela 01).

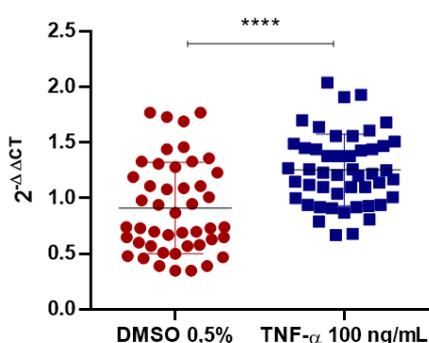
Figura 9 - Critérios de seleção de amostra na triagem primária.

## a) Critérios de Seleção

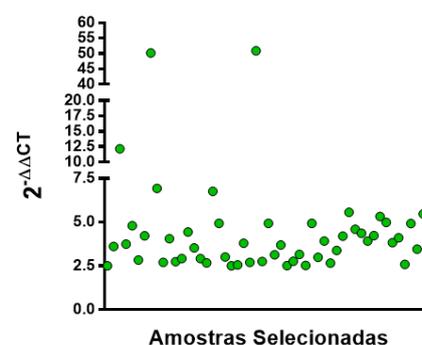
$\Delta\Delta CT$  para os controles  
 DMSO 0,5% =  $0,93 \pm 0,43$   
 TNF- $\alpha$  =  $1,25 \pm 0,32$

1. Foram selecionadas moléculas que aumentaram a expressão do gene COX-2 em mais de 2,2 vezes (média de modulação positiva de COX-2 mais 3 desvios);
2. As moléculas selecionadas deveriam apresentar o ciclo de amplificação para o gene endógeno até 21 (média do ciclo de amplificação do gene endógeno entre as amostras selecionadas mais um desvio);

## b) Distribuição dos Controles na Triagem Primária



## c) Distribuição das amostras de acordo com os critérios de seleção



(a) Os dados obtidos nas análises de qPCR dos tratamentos controle (DMSO 0,5% e TNF- $\alpha$ ) foram utilizados para o estabelecimento dos critérios de seleção. (b) Representação gráfica das análises dos tratamentos DMSO 0,5% e TNF- $\alpha$  (eixo x), e o acréscimo na expressão gênica  $\Delta\Delta Ct$  médio  $\pm$  desvio padrão para cada um (eixo y). A análise estatística dos dados foi feita com teste não paramétrico de Mann-Whitney considerando  $\alpha = 0,05$ .  $p < 0,001$  (\*\*\*). (c) Distribuição das amostras selecionadas quanto a expressão gênica ( $\Delta\Delta Ct$ ). Fonte: Material do autor.

Tabela 1 - Moléculas selecionadas na triagem primária.

Número	Nome	$C_q$ Alvo	$C_q$ Endógeno	Valor de normalização pela amostra calibradora	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1	<i>Disulfiram</i>	25,40	18,87	7,85	2,5
2	<i>Diazepam</i>	25,09	19,10	7,85	3,61
3	<i>Lorazepam</i>	23,51	19,27	7,85	12,15
4	<i>Docetaxel</i>	25,90	19,95	7,85	3,74
5	<i>Piroxicam</i>	25,37	19,78	7,85	4,80
6	<i>Nitrendipine</i>	26,01	19,66	7,85	2,84

<b>Número</b>	<b>Nome</b>	<b>C<sub>q</sub> Alvo</b>	<b>C<sub>q</sub> Endógeno</b>	<b>Valor de normalização pela amostra calibradora</b>	<b>2<sup>-ΔΔCT</sup></b>
7	<i>Etoposide</i>	26,51	20,74	7,85	4,22
8	<i>Cladribine</i>	22,85	20,65	7,85	50,23
9	<i>Fludarabine</i>	25,44	20,39	7,85	6,93
10	<i>Midazolam hydrochloride</i>	27,68	19,64	7,85	2,7
11	<i>Pralidoxime chloride</i>	24,94	19,11	7,85	4,05
12	<i>Tiagabine hydrochloride</i>	25,88	19,48	7,85	2,74
13	<i>Latanoprost</i>	25,29	18,99	7,85	2,92
14	<i>Ampicillin sodium</i>	26,39	19,19	7,85	4,44
15	<i>Ethylestrenol</i>	25,87	19,85	7,85	3,53
16	<i>Lamotrigine</i>	25,41	18,98	7,85	2,92
17	<i>Nizatidine</i>	25,39	18,74	7,85	2,67
18	<i>Nobiletin</i>	24,48	19,39	7,85	6,76
19	<i>Famciclovir</i>	23,83	18,28	7,85	4,93
20	<i>Maltol</i>	23,83	19,73	7,85	3,01
21	<i>GR 79236</i>	25,5	18,97	7,85	2,50
22	<i>Spiroinolactone</i>	25,62	19,12	7,85	2,56

<b>Número</b>	<b>Nome</b>	<b>C<sub>q</sub> Alvo</b>	<b>C<sub>q</sub> Endógeno</b>	<b>Valor de normalização pela amostra calibradora</b>	<b>2<sup>-ΔΔCT</sup></b>
<b>23</b>	<i>Pioglitazone hydrochloride</i>	25,05	19,12	7,85	3,80
<b>24</b>	<i>Tosufloxacin tosilate</i>	19,79	26,20	7,85	2,7
<b>25</b>	<i>Indirubin</i>	21,01	23,19	7,85	50,93
<b>26</b>	<i>Galanthamine hydrobromid</i>	19,52	25,91	7,85	2,755
<b>27</b>	<i>2-Chloroadenosine</i>	19,06	24,60	7,85	4,931
<b>28</b>	<i>Otenzepad</i>	26,52	20,32	7,85	3,14
<b>29</b>	<i>Ozagrel hydrochloride</i>	26,53	20,57	7,85	3,69
<b>30</b>	<i>Alosetron monohydrochlorid e</i>	26,59	20,08	7,85	2,52
<b>31</b>	<i>L-NMMA acetate</i>	26,80	20,41	7,85	2,76
<b>32</b>	<i>Benidipine hydrochloride</i>	26,23	20,04	7,85	3,16
<b>33</b>	<i>Pefloxacin mesylate</i>	26,95	20,43	7,85	2,53
<b>34</b>	<i>Piribedil hydrochloride</i>	25,38	19,83	7,85	4,93
<b>35</b>	<i>Ipidacrine</i>	26,59	20,32	7,85	2,99
<b>36</b>	<i>Selegiline hydrochloride</i>	26,22	20,34	7,85	3,92
<b>37</b>	<i>Bifemelane hydrochloride</i>	26,35	19,91	7,85	2,66

<b>Número</b>	<b>Nome</b>	<b>C<sub>q</sub> Alvo</b>	<b>C<sub>q</sub> Endógeno</b>	<b>Valor de normalização pela amostra calibradora</b>	<b>2<sup>-ΔΔCT</sup></b>
38	<i>Progesterone</i>	26,68	20,58	7,85	3,38
39	<i>TFMPP hydrochloride</i>	25,75	19,97	7,85	4,2
40	<i>Beta-estradiol</i>	25,92	20,55	7,85	5,56
41	<i>Bifonazole</i>	25,97	20,32	7,85	4,59
42	<i>Valaciclovir hydrochloride</i>	26,12	20,40	7,85	4,36
43	<i>Fluperlapine</i>	26,45	20,57	7,85	3,92
44	<i>Loratadine</i>	26,23	20,45	7,85	4,23
45	<i>5-Fluoro-2-pyrimidone</i>	25,78	20,34	7,85	5,33
46	<i>Cetraxate hydrochloride</i>	25,88	20,35	7,85	4,98
47	<i>Lamivudine</i>	26,81	20,90	7,85	3,83
48	<i>Clonidine hydrochloride</i>	26,89	21,08	7,85	4,11
49	<i>Losartan potassium</i>	27,28	20,80	7,85	2,59
50	<i>Scopolamine hydrobromide</i>	25,84	20,28	7,85	4,92
51	<i>Urapidil hydrochloride</i>	26,31	20,25	7,85	3,46
52	<i>Salbutamol sulfate</i>	25,90	20,51	7,85	5,47

Número	Nome	C <sub>q</sub> Alvo	C <sub>q</sub> Endógeno	Valor de normalização pela amostra calibradora	2 <sup>-ΔΔCT</sup>
53	Atomoxetine hydrochloride	25,76	19,53	7,85	3,08

C<sub>q</sub> Alvo: Ciclo de Quantificação do Gene Alvo; C<sub>q</sub> Endógeno: Ciclo de Quantificação do Gene Endógeno; 2<sup>-ΔΔCT</sup>: Expressão matemática para quantificação de acréscimo/decrécimo de expressão gênica, para maiores detalhes vide o item 3.6.4. Fonte: Material do autor.

Destas, na triagem secundária (Figura 9 e Tabela 02), duas moléculas obtiveram destaque: indirubina (PubChem: 46386581) e piroxicam (PubChem: 46386918). No entanto, o piroxicam apresentou um ciclo de amplificação do gene endógeno acima do valor estipulado no critério de seleção (Figura 10).

Figura 10 – Critérios de seleção de amostras na triagem secundária.

a) Critérios de Seleção

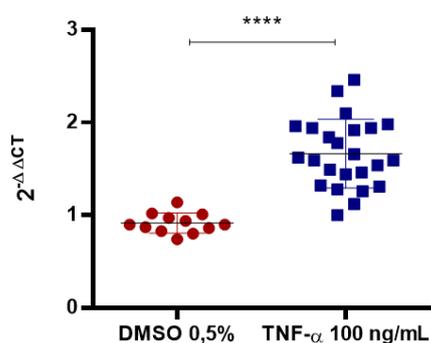
ΔΔCT para os controles

DMSO 0,5% = 0,92 ± 0,10

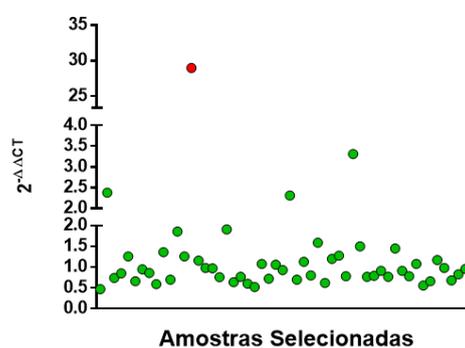
TNF-α = 1,66 ± 0,37

1. Foram selecionadas moléculas que aumentaram a expressão do gene COX-2 em mais de 2,8 vezes (média de modulação positiva de COX-2 mais três desvios);
2. As moléculas selecionadas deveriam apresentar o ciclo de amplificação para o gene endógeno até 21,5 (média do ciclo de amplificação do gene endógeno entre as amostras selecionadas mais um desvio);

b) Distribuição dos Controles na Triagem Secundária



c) Distribuição das amostras de acordo com os critérios de seleção



(a) Os dados obtidos nas análises de qPCR dos tratamentos controle foram utilizados para o estabelecimento dos critérios de seleção. (b) Representação gráfica das análises dos tratamentos controle, DMSO 0,5% e TNF-α (eixo x), e o incremento de expressão gênica ΔΔCT médio ± desvio padrão para cada um (eixo y). Análise estatística dos dados foi feita com teste não paramétrico de Mann-Whitney considerando  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significativo),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). (c) Distribuição das amostras selecionadas pelos critérios de seleção, sendo que as coloridas em vermelho são os alvos selecionados. Fonte: Material do autor.

Tabela 2 - Moléculas de destaque na triagem secundária.

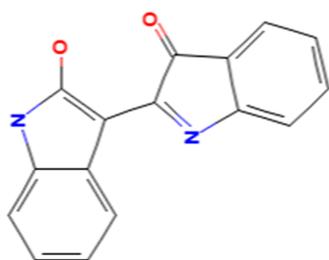
Número	Nome	C <sub>q</sub> Alvo	C <sub>q</sub> Endógeno	Valor de normalização pela amostra calibradora	2 <sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup>
1	<i>Indirubin</i>	23,3	21,0	7,14	29
2	<i>Piroxicam</i>	28,1	22,7	7,14	3,31

C<sub>q</sub> Alvo: Ciclo de Quantificação do Gene Alvo; C<sub>q</sub> Endógeno: Ciclo de Quantificação do Gene Endógeno; 2<sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup>: Expressão matemática para quantificação de expressão gênica, para maiores detalhes vide o item 3.6.4. Fonte: Material do autor.

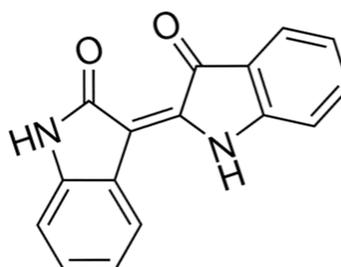
Nos experimentos seguintes, optamos por investigar mais a fundo a ação da molécula indirubina sobre UC-MSC, uma vez que esta apresentou um acréscimo de 29 vezes na expressão de COX-2 em comparação ao tratamento com DMSO 0,5%. Tem-se que a indirubina é um produto natural isolado de plantas e bactérias, e há investigações sobre seu uso na atividade anti-inflamatória e antitumoral (PubChem: 46386581). Para as análises de validação, foi adquirida a molécula comercial Sigma-Aldrich - PHL89716 por se tratar de um dos isômeros mais próximos à molécula presente na biblioteca utilizada (Figura 11).

Figura 11. Estrutura química da indirubina.

a) Molécula da biblioteca (PubChem: 46386581)  
- Indirubina C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



b) Molécula Comercial (Sigma-Aldrich - PHL89716 )  
- Indirubina C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

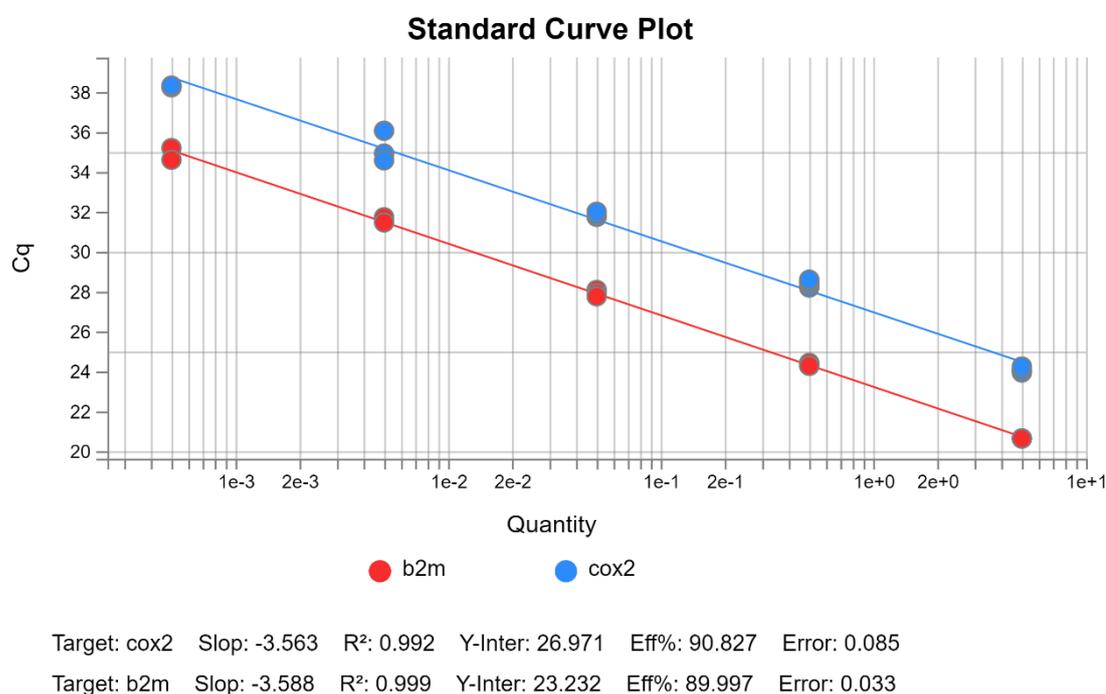


Na figura tem-se em (a) a molécula presente na biblioteca e utilizada na triagem. Já em (b), a molécula comercial adquirida. Fonte: PubChem e site da empresa Sigma-Aldrich (Merck).

Para a validação do isômero de indirubina como molécula moduladora para a expressão de COX-2, foram feitas diluições seriadas em fator 2, de 50 a 0,8 μM, e adicionada à cultura de células. Após 72 horas, o RNA total e as proteínas foram

extraídos de cada condição para as análises de qPCR e WB. É importante ressaltar que foram feitas algumas mudanças para lapidar as análises. Uma delas foi diminuir a porcentagem de DMSO no ensaio de 0,5% para 0,25% (condição mais próxima à menor concentração de DMSO presente no composto). Outro ponto foi que a extração do material genético foi feita com kit comercial RNeasy (QIAGEN), e uma nova curva de eficiência foi feita para as sondas de hidrólise. Foi aplicado um fator de diluição 1:10 e *cycle threshold* de 0,08, garantindo inclinação similares (COX-2: -3,58; B2M:-3,59) e eficiência de 90% (Figura 12). Estabelecidos estes novos parâmetros, partiu-se para a análise.

Figura 12 – Nova curva de eficiência.



Foi estabelecida uma nova curva com diluição a 1:10 para avaliar a eficiência das sondas. Isto permitiu *slopes* (slop) mais próximos e eficiência (eff%) de 90%. Fonte: Material do Autor.

Observou-se que a indirubina (Figura 13a) modulou positivamente a expressão gênica de COX-2 nas concentrações de 50 e 25  $\mu\text{M}$  em comparação ao tratamento com DMSO 0,25% ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  50  $\mu\text{M}$  =  $7,49 \pm 4,10$ ;  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  25  $\mu\text{M}$  =  $4,25 \pm 2,70$ ;  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  DMSO 0,25 =  $1,62 \pm 0,60$ ) (Figura 13b). Na dosagem de proteínas, a intensidade de sinal da banda de COX-2 também é mais forte nestas duas concentrações em três experimentos independentes (Figura 13c). Nos demais tratamentos, notou-se que a

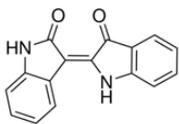
intensidade do sinal foi diminuindo gradualmente até a menor concentração de indirubina (Figura 13c).

Posteriormente, foi observado o comportamento dos dados em curva de dose resposta, a fim de avaliar a intensidade do efeito da molécula (mínimo, intermediário e máximo) em função de uma faixa de concentração da mesma por um determinado período de tempo (BITTKER, 2012). Foi avaliada a intensidade de efeito da indirubina na faixa de 50 a 0,8  $\mu\text{M}$  sobre a expressão gênica após 72 horas.

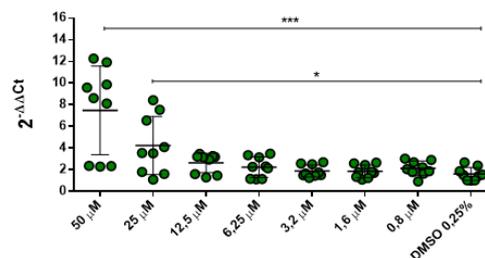
Não foi possível observar ponto de inflexão na curva (Figura 13d). Isto indica que, dentro da faixa e período analisados, não foi possível observar o efeito máximo de expressão gênica de COX-2, e que ele ocorreria em concentrações acima de 50  $\mu\text{M}$ . É importante ressaltar que a curva de dose-resposta fornece dados teóricos sobre a EC50: concentração que garante 50% do efeito, e que sua determinação será essencial para os futuros ensaios funcionais *in vitro*. Em conjunto, os resultados demonstraram que a indirubina modulou a expressão gênica e proteica de COX-2 na UC-MSC 03, contudo, outros experimentos são necessários para observar a intensidade dessa resposta.

Figura 13 – Validação de indirubina como modulador da expressão gênica e proteica de COX-2 e avaliação de curva dose-resposta.

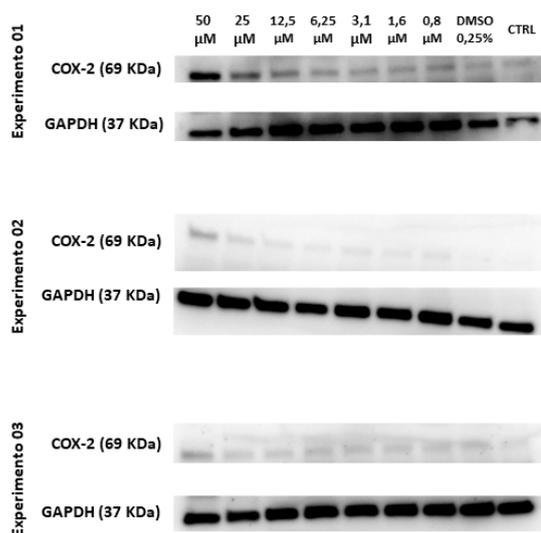
a) Molécula de Indirubina



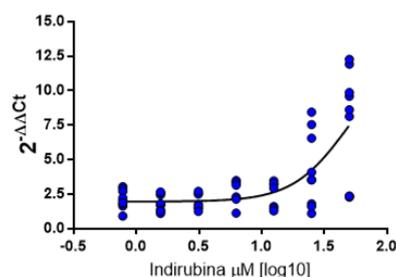
b) Incremento de expressão gênica em COX-2



c) Expressão de Proteína COX-2



d) Curva de Dose-Resposta



A molécula indirubina (a) foi diluída seriadamente (50 a 0,8  $\mu M$ ), e as concentrações obtidas juntamente com as condições DMSO 0,25% e controle foram utilizadas para tratamento da linhagem UC-MSC 03. Após 72 horas, foi feito a qPCR e o *western blot*. (b) O gráfico representa a avaliação da expressão gênica (eixo y) em relação às condições experimentais (eixo x). Os dados indicam o valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  médio em cada condição  $\pm$  desvio padrão amostral. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis mais teste comparativo de Dunn considerando  $\alpha = 0,05$ .  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). (c) Análises de *western blot*, onde observa-se a expressão de COX-2 (76 kDa) em resposta às condições experimentais. Como controle endógeno, usou-se a proteína GAPDH. (d) As concentrações de indirubina de 50 a 0,8  $\mu M$  foram avaliadas em uma reação de qPCR e os dados foram analisados em uma curva de dose resposta. Foram feitas nove replicatas experimentais, sendo que cada unicata é representada por uma bolinha de cor azul. O Gráfico apresenta no eixo x as concentrações convertidas em log na base 10. O eixo y apresenta o valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Fonte: Material do autor.

## 4.5 Resultados preliminares associados a análise funcional *in vitro* e modelo animal para GvHD

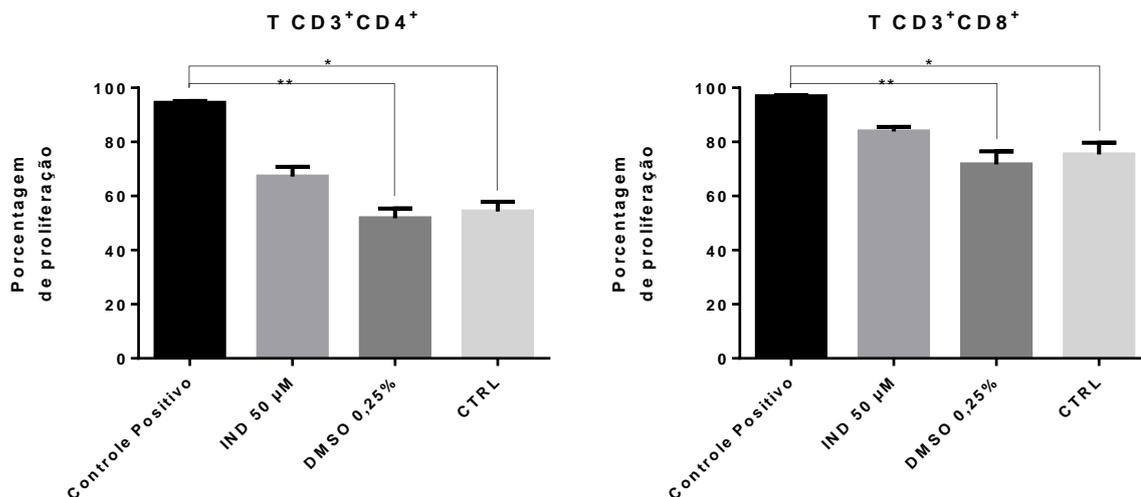
### 4.5.1 Ensaio de imunomodulação

Embora não tenhamos determinado a EC50 da indirubina, optamos por testar a metodologia de co-cultivo como forma de verificar a funcionalidade de molécula *in vitro*. Para tanto,  $1 \times 10^5$  MSC foram pré-tratadas com mitomicina C e condicionadas com indirubina a 50  $\mu\text{M}$ , DMSO 0,25% e condição controle (CTRL) por 72 horas. Em seguida, os poços receberam uma suspensão de  $5 \times 10^5$  PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com mitógeno PHA. Ao fim de seis dias, as células foram colhidas e a proliferação de linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foi mensurada por citometria de fluxo em comparação ao controle positivo de proliferação (Controle Positivo: células tratadas com PHA sem influência das MSC).

Foi observada a queda de proliferação dos linfócitos nas três condições (TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> média controle positivo:  $94,5 \pm 0,6\%$ ; indirubina 50  $\mu\text{M}$ :  $67,2 \pm 3,6$ ; DMSO 0,25%:  $51,8 \pm 3,6\%$ ; CTRL:  $54,3 \pm 3,5\%$ ) (TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> média controle positivo:  $96,9 \pm 0,6\%$ ; indirubina 50  $\mu\text{M}$ :  $83,6 \pm 1,7$ ; DMSO 0,25%:  $71,7 \pm 4,9\%$ ; CTRL:  $75,4 \pm 4,3\%$ ). No entanto, tanto na análise de TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> quanto na de TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, observou-se maior proliferação das células no co-cultivo com indirubina em comparação àquelas tratadas com DMSO 0,25% e CTRL.

Este resultado foi o oposto do que esperávamos. No entanto, trata-se de apenas um único experimento e ainda é possível explorar outras abordagens para se fazer conclusões.

Figura 14 – Ensaio de imunomodulação para avaliação funcional da indirubina.



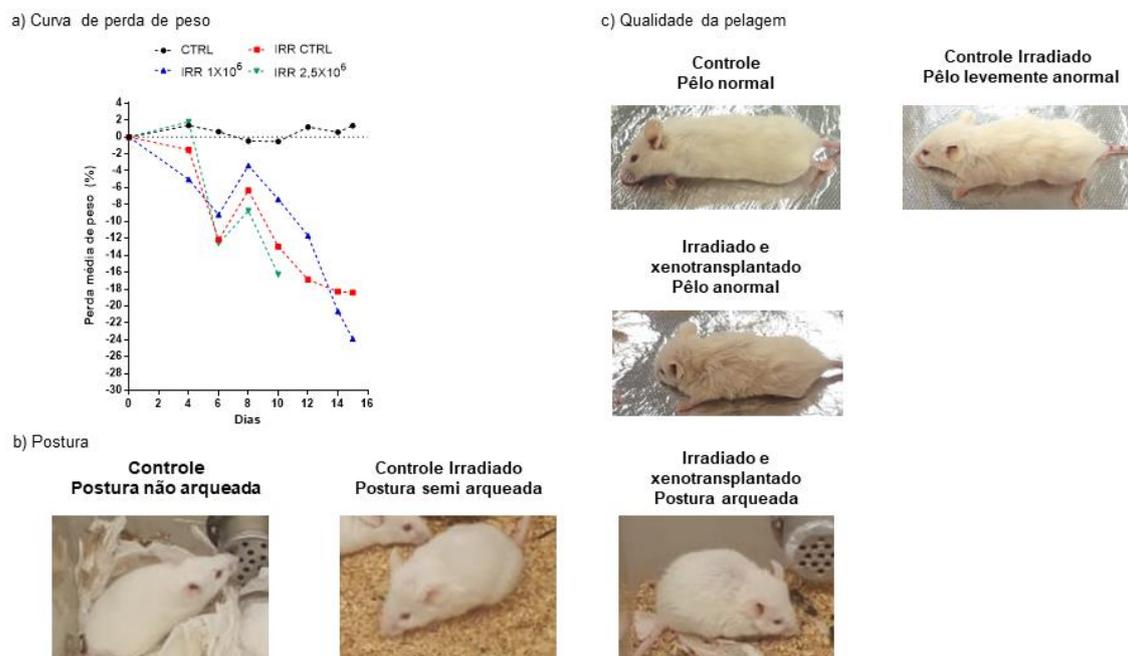
A UC-MSC 03 foi condicionada em três tratamentos: indirubina a 50 μM, DMSO 0,25% e condição controle (CTRL). Em seguida, PBMC estimulados com o mitógeno PHA foram adicionados sobre as monocamadas para o co-cultivo (controle positivo). O gráfico indica a porcentagem média ± desvio padrão amostral de células T CD3+CD4+ e T CD3+CD8+ nas condições de controle positivo e co-cultivo. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn considerando  $\alpha = 0,05$ .  $p > 0,05$  (não significativa). Fonte: Material do Autor.

#### 4.5.2 Modelo de GvHD Murino

Para a padronização do modelo GvHD murino, adotamos a estratégia de Jang *et al.* (2014) com modificações. Os animais foram irradiados com 2 Gy e infundidos com  $1$  e  $2,5 \times 10^6$  PBMC. O experimento foi conduzido durante 15 dias. Os animais foram acompanhados e avaliados diariamente quanto ao peso corpóreo, comportamento (postura e atividade), características morfológicas (aparência da pelagem e pele) e a presença de linfócitos humanos.

Em comparação aos animais não irradiados (CTRL), os animais irradiados que não receberam PBMC (CTRL IRR) demonstraram perda de peso (menos de 18% do peso original ao fim do experimento), postura semi-arqueada e pequena redução na motilidade (Figuras 15a e 15b). Os camundongos irradiados e com infusão de  $1 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^6$  de PBMC (IRR  $1 \times 10^6$  e IRR  $2,5 \times 10^6$ ) demonstraram perda de peso (menos de 24% do peso original), postura completamente arqueada e motilidade baixa ou ausente (Figuras 15a e 15b). A pelagem dos animais submetidos aos tratamentos também foi alterada, tornando-se mais opaca e eriçada em comparação ao controle (Figura 15c). Não foram observadas alterações na integridade da pele.

Figura 15 – Avaliação comportamental dos animais.



Os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais: (CTRL) animais não irradiados e sem infusão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC); (IRR CTRL) animais somente irradiados e sem infusão de PBMC; (IRR  $1 \times 10^6$ ) animais irradiados e com infusão de  $1 \times 10^6$  PBMC e (IRR  $2,5 \times 10^6$ ) animais irradiados e com infusão de  $2,5 \times 10^6$ . (a) Após o xenotransplante, os animais foram acompanhados por 15 dias para monitoramento da perda de peso. Cada ponto no gráfico representa a porcentagem de perda média de peso do grupo em relação ao seu peso médio no dia 0. Os animais foram avaliados quanto a (b) postura (postura não arqueada, semi arqueada e arqueada) e (c) pelagem (normal, levemente anormal e anormal). Fonte: Material do autor.

Além da observação qualitativa dos parâmetros: postura, atividade, textura do pelo e integridade da pele, foi feita a análise por sistema de pontuação conforme descrito por JANG *et al.*, 2016. Neste caso, dentro de cada parâmetro, o que se considerou normal recebeu pontuação 0. Levemente anormal, pontuação 1 e anormal pontuação 2. O sistema de pontuação permite quantificar a evolução dos sintomas de GvHD.

Os animais do grupo CTRL apresentaram comportamento normal dentro dos parâmetros e o seu sistema de pontuação foi de no máximo 1 ponto ao longo dos 14 dias (Tabela 03). O grupo IRR CTRL (Tabela 04) demonstrou comportamento predominantemente normal por pelo menos 8 dias. Do décimo dia em diante, seu comportamento foi levemente anormal. Sua pontuação dentro do período de 14 dias foi de no máximo 4 pontos.

Tabela 3 – Avaliação comportamental do grupo controle.

DIA	ZERO	QUARTO	SEXTO	OITAVO	DÉCIMO	DÉCIMO SEGUNDO	DÉCIMO QUARTO
NÚMERO DE ANIMAIS ANALISADOS	4	4	4	4	4	3	3
PERDA DE PESO	0	0	0	1	1	0	0
POSTURA CORPORAL	0	0	0	0	0	0	0
ATIVIDADE	0	0	0	0	0	0	0
TEXTURA DO PELO	0	0	0	0	0	0	0
INTEGRIDADE DA PELE	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	1	1	0	0

Parâmetro e pontuações utilizadas para avaliação do comportamento dos animais: Perda de peso (<10%:0; >10<25:1; >25:2); Postura corporal, atividade, textura do pelo e integridade da pele (0 normal; 1 levemente anormal e 2 anormais). Os valores de cada parâmetro presente na tabela correspondem à média de pontuação obtida entre animais analisados e está apresentada em números inteiros.

Tabela 4 – Avaliação comportamental do Grupo Controle Irradiado.

DIA	ZERO	QUARTO	SEXTO	OITAVO	DÉCIMO	DÉCIMO SEGUNDO	DÉCIMO QUARTO
NÚMERO DE ANIMAIS ANALISADOS	5	5	4	4	4	2	2
PERDA DE PESO	0	0	1	0	1	1	1
POSTURA CORPORAL	0	0	0	0	0	1	1
ATIVIDADE	0	0	0	0	1	1	1
TEXTURA DO PELO	0	0	0	0	1	1	1
INTEGRIDADE DA PELE	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	1	0	3	4	4

Parâmetro e pontuações utilizadas para avaliação do comportamento dos animais: Perda de peso (<10%:0; >10<25:1; >25:2); Postura corporal, atividade, textura do pelo e integridade da pele (0 normal; 1 levemente anormal e 2 anormais). Os valores de cada parâmetro presente na tabela correspondem à média de pontuação obtida entre animais analisados e está apresentada em números inteiros.

Dentro dos animais irradiados e com infusão de células, observou-se que o comportamento do grupo IRR  $1 \times 10^6$  (Tabela 05) foi em grande parte normal por pelo menos 8 dias, assim como o demonstrado pelo IRR CTRL. Após o décimo dia, seu comportamento foi de levemente anormal (dia 12), com pontuação total de 4 pontos, a anormal (dia 14), com pontuação total de 7 pontos. Os animais IRR  $2,5 \times 10^6$  obtiveram um comportamento similar aos demais. No entanto, apesar de demonstrar um comportamento levemente anormal no dia 10, sua pontuação neste momento foi de 6 pontos.

Tabela 5 – Avaliação comportamental do Grupo Irradiado e com infusão de  $1 \times 10^6$  PBMC.

DIA	ZERO	QUARTO	SEXTO	OITAVO	DÉCIMO	DÉCIMO SEGUNDO	DÉCIMO QUARTO
NÚMERO DE ANIMAIS ANALISADOS	6	6	4	3	3	2	2
PERDA DE PESO	0	1	0	0	0	1	1
POSTURA CORPORAL	0	0	0	0	1	1	2
ATIVIDADE	0	0	0	0	0	1	2
TEXTURA DO PELO	0	0	0	0	0	1	2
INTEGRIDADE DA PELE	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	1	0	0	1	4	7

Parâmetro e pontuações utilizadas para avaliação do comportamento dos animais: Perda de peso (<10%:0; >10<25:1; >25:2); Postura corporal, atividade, textura do pelo e integridade da pele (0 normal; 1 levemente anormal e 2 anormais). Os valores de cada parâmetro presente na tabela correspondem à média de pontuação obtida entre animais analisados e está apresentada em números inteiros.

Tabela 6 – Avaliação comportamental do Grupo Irradiado em infusão de  $2,5 \times 10^6$  PBMC

DIA	ZERO	QUARTO	SEXTO	OITAVO	DÉCIMO	DÉCIMO SEGUNDO	DÉCIMO QUARTO
NÚMERO DE ANIMAIS ANALISADOS	5	5	4	2	2	---	---
PERDA DE PESO	0	0	1	0	1	---	---
POSTURA CORPORAL	0	0	0	0	2	---	---
ATIVIDADE	0	0	0	0	1	---	---
TEXTURA DO PELO	0	0	0	0	1	---	---
INTEGRIDADE DA PELE	0	0	0	0	1	---	---
TOTAL	0	0	1	0	6	---	---

Parâmetro e pontuações utilizadas para avaliação do comportamento dos animais: Perda de peso (<10%:0; >10<25:1; >25:2); Postura corporal, atividade, textura do pelo e integridade da pele (0 normal; 1 levemente anormal e 2 anormais). Os valores de cada parâmetro presente na tabela correspondem à média de pontuação obtida entre animais analisados e está apresentada em números inteiros.

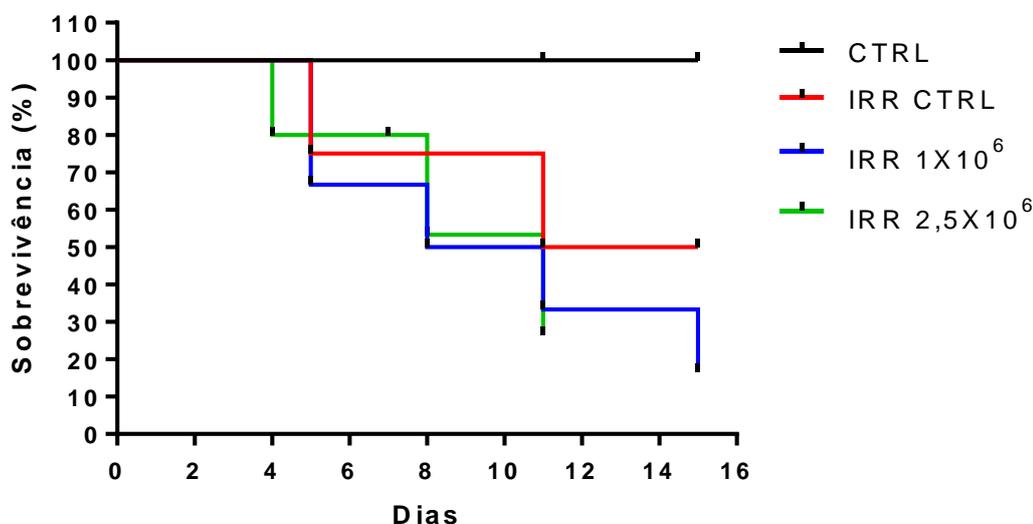
Posteriormente, foi feita a análise de sobrevivência dos grupos usando a curva Kaplan-Mayer. De acordo com a Figura 16, dentro do período de 4 a 6 dias, pelo menos um animal de cada grupo em tratamento morreu. A taxa de sobrevivência neste período foi de: 80% para animais do grupo IRR  $2,5 \times 10^6$ ; 72% para IRR CTRL; e 67% para IRR  $1 \times 10^6$ .

Entre 6 e 8 dias, os grupos IRR  $1 \times 10^6$  e IRR  $2,5 \times 10^6$  perderam 1 e 2 animais, respectivamente, e a taxa de sobrevivência caiu para pelo menos 50%. O grupo IRR CTRL estabilizou-se e manteve sua taxa de sobrevivência de 72%. Estes valores de taxa de sobrevivência mantiveram-se constantes até o dia 10. Após este momento, os

grupos tratados tiveram pelo menos uma morte. O grupo IRR  $2,5 \times 10^6$  foi finalizado com 11 dias com taxa de sobrevivência de 30%. Como havia somente um único animal, este por sua vez foi eutanasiado para coleta de amostras de sangue periférico e análise dos órgãos. Para garantir uma análise uniforme entre os demais grupos, um animal de cada um deles também foi eutanasiado para coleta das mesmas amostras.

O grupo IRR  $1 \times 10^6$  foi interrompido dentro de 15 dias com taxa de sobrevivência de 20%. Mais uma vez, como havia somente um animal sobrevivente foi feita a eutanásia de um animal de cada grupo seguida da coleta de sangue periférico e análise de órgãos.

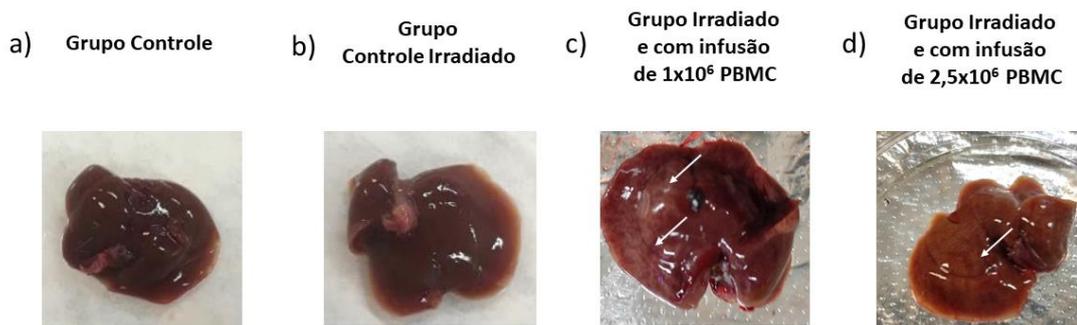
Figura 16 – Curva de sobrevivência dos grupos experimentais.



Foi feita a curva de sobrevivência dos quatro grupos experimentais. São eles: (CTRL) animais não irradiados e sem infusão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC); (IRR CTRL) animais somente irradiados e sem infusão de PBMC; (IRR  $1 \times 10^6$ ) animais irradiados e com infusão de  $1 \times 10^6$  PBMC e (IRR  $2,5 \times 10^6$ ) animais irradiados e com infusão de  $2,5 \times 10^6$ . Na curva, cada óbito dentro de um grupo é marcado por uma quebra no segmento da linha e isto é indicado por um ponto preto. Onde há pontos pretos e não há a quebra significa que a morte em questão não está associada ao tratamento. Fonte: Material do autor.

Na análise dos órgãos, observou-se que o fígado apresentou mudança de coloração nos grupos IRR com PBMC (Figura 17).

Figura 17 - Coloração do órgão fígado nos grupos experimentais.

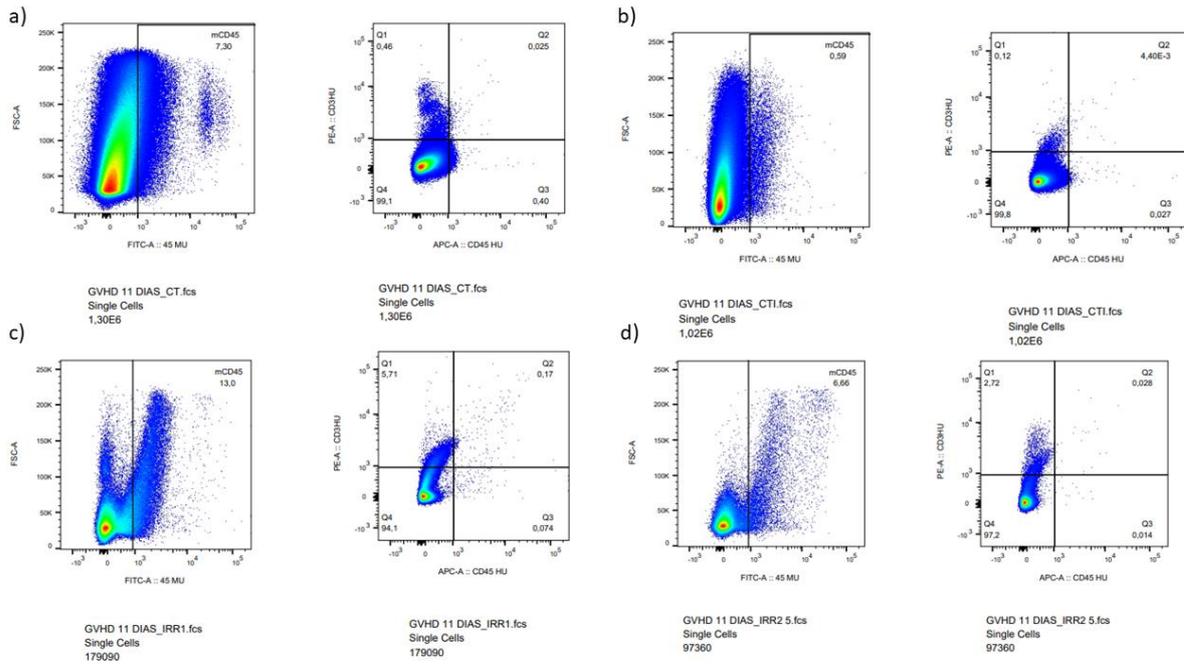


Análise qualitativa do fígado de um animal em cada condição experimental. Grupos controle e controle irradiado apresentam fígado em coloração normal. Já o órgão proveniente de um animal irradiado e com infusão de células humanas apresenta tons de coloração amarelada, como indicado nas setas brancas. Fonte: Material do autor.

Para averiguar se havia a presença de células humanas nos animais, foi aplicada a técnica de citometria de fluxo em células obtidas do sangue periférico dos camundongos com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD45 humanos e anti-CD45 murino. Foram adquiridos pelo menos  $1 \times 10^6$  eventos. A marcação com CD45 murino foi utilizada para exclusão de células murinas da análise.

A marcação inespecífica encontrada destes marcadores nos animais CTRL e CTRL IRR foi menor que 0,6% em CD3 (Figuras 18a e 18b). Após o desconto de marcação inespecífica, os resultados demonstraram que, no período de 11 dias, foram encontradas cerca de 5,1% células CD3+ humanas em camundongos IRR  $1 \times 10^6$  e 2,1% em IRR  $2,5 \times 10^6$  (Figuras 18c e 18d), respectivamente. A porcentagem de células CD45+ humano ou duplo positivo foi muito próxima da marcação inespecífica nos dados de CTRL e CTRL IRR e por isso considerada ausente (Figura 18).

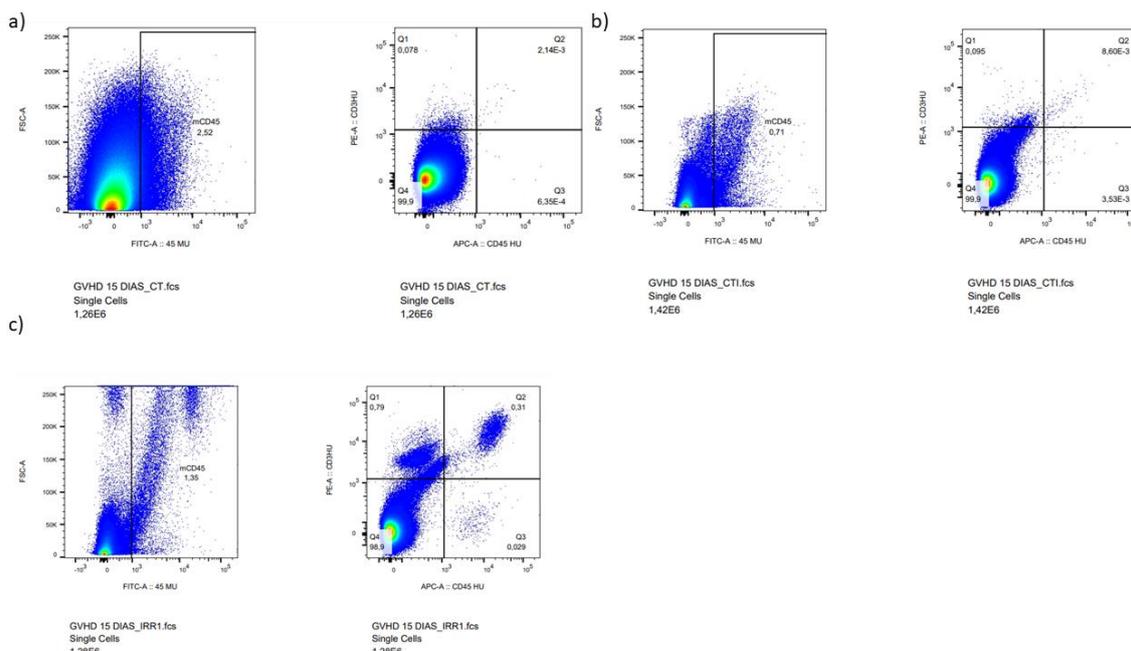
Figura 18 – Avaliação da presença de células humanas nos animais em 11 dias.



O sangue periférico dos animais foi utilizado para análise de citometria de fluxo. Foi investigada a presença de células CD3<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup> humanas e CD45<sup>+</sup> murinas. Em (a) e (b) é averiguado a porcentagem de células positivas para estes marcadores em sangue periférico de animal controle (CT) e animal controle irradiado (CTI), respectivamente. Em (c) e (d), tem-se as análises do animal irradiado e infundido com  $1 \times 10^6$  (IRR1) e animal irradiado e infundido com  $2,5 \times 10^6$  (IRR2,5), respectivamente. Fonte: Material do autor.

No material obtido de animais eutanasiados após 15 dias, nos animais CTRL e CTRL IRR a marcação inespecífica foi menor que 0,2 % para CD3<sup>+</sup> e 0,01% para CD45<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Figura 19). Foram encontradas em camundongos IRR  $1 \times 10^6$  cerca de 0,6% de células CD3<sup>+</sup>, 0,025% CD45<sup>+</sup> e 0,3% CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>.

Figura 19 – Avaliação da presença de células humanas nos animais após 15 dias.



O sangue periférico dos animais foi utilizado para análise de citometria de fluxo. Foi analisada a presença de células CD3<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup> humanas e CD45<sup>+</sup> murinas. Em (a) e (b) é averiguado a porcentagem de células positivas para estes marcadores em sangue periférico de animal controle (CT) e animal controle irradiado (CTI), respectivamente. Em (c), tem-se as análises do animal irradiado e infundido com  $1 \times 10^6$  PBMC (IRR1). Fonte: Material do autor.

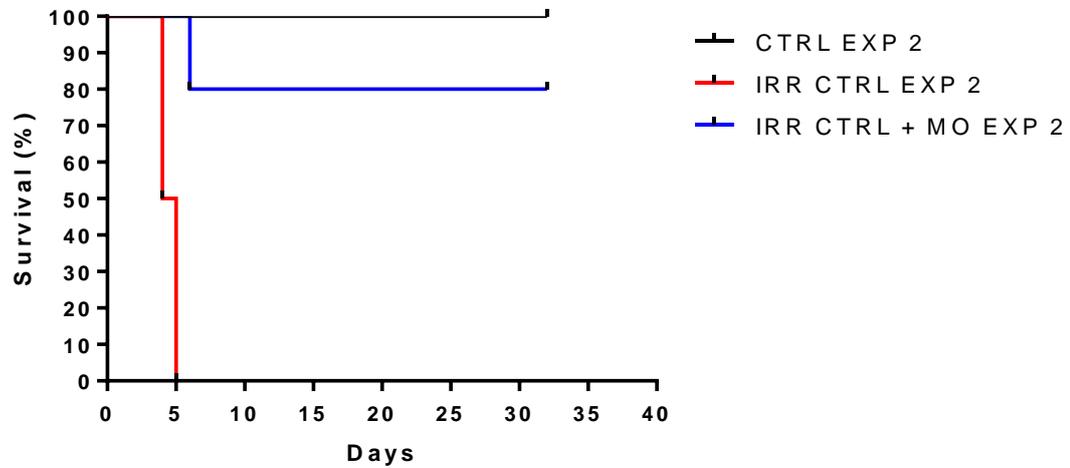
Em conjunto, os resultados indicam que há uma alteração comportamental dos animais tratados frente aos animais controle. No entanto, há uma sobreposição do que seria efeito da própria irradiação nos animais ou a presença de células humanas.

Para intervir no efeito da irradiação, foi adicionada uma etapa de infusão de lavado medular murino de  $0,25 \times 10^6$  após a irradiação. Para tanto, os animais foram divididos em três grupos: animais sem irradiação e sem lavado medular (CTRL, n=4); controle irradiado 2 Gy e sem lavado medular (IRR CTRL, n=6) e controle irradiado com 2 Gy mais lavado medular (IRR CTRL + MO, n=6).

O experimento dois foi conduzido por 32 dias (Figura 20). Dentro deste período, todos os animais grupo IRR CTRL morreram de 4 a 5 dias após a irradiação (Taxa de sobrevivência de 50% dentro de 5 dias). No grupo IRR CTRL + MO somente uma morte no dia 6 (taxa de 80% dentro de 32 dias). A pesagem dos grupos foi conduzida diariamente por 20 dias. Ao final deste período, o peso médio do grupo CTRL foi de  $22,37 \pm 1,46$  g e o do grupo IRR CTRL + MO foi de  $21,87 \pm 2,66$  g. O comportamento dos animais tanto no grupo CTRL quanto do IRR CTRL + MO foi normal dentro de 32 dias. Estes resultados demonstraram que, para avaliarmos o efeito de PBMC humano

como causador de GvHD, precisaremos da presença do grupo IRR CTRL + MO, pois ele retira a influência da irradiação sobre os dados.

Figura 20 – Curva de sobrevivência dos grupos experimentais no segundo experimento.



Foi feita a curva de sobrevivência dos grupos experimentais. São eles: animais não irradiados e sem infusão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (CTRL EXP 2); animais somente irradiados e sem infusão de PBMC (IRR CTRL EXP2); animais irradiados e com infusão de  $0,25 \times 10^6$  lavado medular murino (IRR CTRL + MO). Na curva, cada óbito dentro de um grupo é marcado por uma quebra no segmento da linha e isto é indicado por um ponto preto. Fonte: Material do autor.

## 5. Discussão

As células mesenquimais são amplamente utilizadas em terapia celular. Seus benefícios clínicos permeiam a diferenciação em linhagens osteocartilaginosas, a produção de fatores solúveis para manutenção, sobrevivência e proliferação de células alvo, a modulação do sistema imunológico e o endereçamento de células para locais de inflamação (NAJAR *et al.*, 2022).

A grande diversidade de abordagens clínicas nas quais as MSC são empregadas exigem condições de cultivo adequadas à aplicação, principalmente em se tratando do meio de cultura. Na expansão das MSC *ex vivo*, geralmente são utilizados os meios basais como DMEM, D-MEM F12 e  $\alpha$ -MEM. Até uma década atrás, grande parte dos ensaios clínicos utilizava estes meios suplementados com SFB, um produto de origem animal rico em proteínas, fatores de crescimento e outras importantes biomoléculas. Atualmente, esta prática é desencorajada pelas agências regulatórias pelo risco de respostas imunológicas decorrentes de agentes infecciosos e proteínas de origem animal (BUI; NGUYEN; THAN, 2021; CIMINO *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2017).

A suplementação alternativa ao SFB é denominada meio livre de soro (do inglês, *serum-free media*) ou meio livre de xenoantígenos (do inglês, *xeno-free media*). Pode-se utilizar duas estratégias para produção deste tipo de tecnologia. A primeira consiste no uso de derivados do sangue humano, como soro, plasma e lisado de plaquetas, como suplementação direta do meio. A segunda, conhecida como meio quimicamente definido (do inglês, *chemically defined media*, CMD), é quando se utiliza meios suplementados com moléculas humanas, podendo estas serem de origem recombinante, sintética ou purificadas. Além da segurança, uma suplementação alternativa ao SFB deve considerar o custo de implementação, o tempo de prateleira e a disponibilidade (BUI; NGUYEN; THAN, 2021; CIMINO *et al.*, 2017; OIKONOMOPOULOS *et al.*, 2015; PITTENGER *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2017).

O PHCS enquadra-se na primeira estratégia. Sua produção consiste no *pool* de plasma AB+ de 6 doadores de sangue, seguida da precipitação de fibrina com  $\text{CaCl}_2$  e esterilização por filtração. De acordo com dos Santos *et al.* (2017), este produto apresenta alta rentabilidade e perfil bioquímico estável durante 12 meses. O fato de a matéria prima ser proveniente de bancos de sangue garante a fácil disponibilidade aliada à qualidade e segurança, dada a existência de um algoritmo

para a seleção de doadores e testes sorológicos e moleculares que garantem a ausência de endotoxinas, de contaminação por micoplasma e por vírus. Ademais, o uso de *pool* de doadores também evita a variabilidade lote a lote do produto.

Durante a execução da nossa proposta, o uso do PHCS garantiu o processo de isolamento, a preservação das características inerentes a uma MSC e a propriedade imunomoduladora. Nossos resultados demonstram o isolamento bem-sucedido de linhagens de MSC provenientes de três amostras de cordão umbilical. Todas elas apresentaram aderência ao plástico e exibiram a morfologia fibroblastoide típica de MSC. O perfil imunofenotípico também se manteve adequado, assim como a capacidade de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Estes achados indicam a reprodutibilidade do protocolo de isolamento elaborado por Prata *et al.* (2012), e são concordantes com os dados reportados por dos Santos *et al.* (2017) quanto ao uso do PHCS como fonte alternativa que garante as características de uma célula mesenquimal.

Em nossos resultados, também foi analisado se a UC-MSc 03 se apresentava como imunomoduladora funcional *in vitro*. Observamos que, nas proporções de 1:10 e 1:20, a contenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi dose-dependente. Estes resultados alinham-se aos achados de dos Santos *et al.* (2017), reiterando que, além de preservar as características de uma UC-MSc, o PHCS garante também a sua funcionalidade.

Há um grande repertório de informações sobre como a atividade parácrina das MSC é utilizada na terapia celular, especialmente em se tratando de imunomodulação. Isto permite o desenvolvimento de diversas estratégias para modular o secretoma destas células. Em se tratando de *priming* com citocinas inflamatórias, o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são as principais citocinas relatadas como moduladores da atividade imunossupressora das MSC. Outras abordagens fazem uso de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-17. Alternativamente, é utilizado um *pool* de citocinas, ou até mesmo o uso do *pool* associado a técnicas de cultivo alternativas (DE WITTE *et al.*, 2017; HYLAND *et al.*, 2020; MEISEL *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2007; SRINIVASAN *et al.*, 2022)

Na particularidade das UC-MSc, há o relatos de *priming* das células que combinam condições de cultivo em normóxia e hipóxia com citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  (HYLAND *et al.*, 2020). Neste caso, Hyland *et al.* (2020) demonstraram que as vesículas extracelulares derivadas de UC-MSc apresentaram conteúdo proteico alterado quando cultivadas em condição de normóxia associada ao

uso de citocinas pró-inflamatórias, em comparação à condição controle (células em normóxia). O mesmo comportamento foi observado na associação de hipóxia e citocinas inflamatórias. Neste estudo, as proteínas moduladas foram relacionadas a processos de angiogênese e quimiotaxia.

É importante dizer que a estratégia de *priming* depende também da composição do meio de cultura utilizado. No estudo de Oikonomopoulos *et al.* (2015), foi avaliada a influência do *priming* com IFN- $\gamma$  em BM-MSC e AT-MSC utilizando meio DMEM suplementado com SFB ou lisado plaquetário (do inglês, *platelet lysate*, PL) e StemPro® MSC SFM XenoFree (invitrogen). Os resultados demonstraram que o perfil imunofenotípico das células foi o mesmo em cada uma das formulações de meio de cultura. Houve um aumento significativo na proliferação das linhagens cultivadas com DMEM + PL e StemPro® MSC SFM XenoFree, ambos acrescidos de citocinas inflamatórias. No entanto, a capacidade imunomoduladora foi reduzida em meio DMEM suplementado com PL em comparação ao DMEM suplementado com SFB e StemPro® MSC SFM XenoFree.

Na nossa proposta, o foco foi a ação da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  como modulador positivo de COX-2. Este eixo é relatado tanto em MSC humanas como em outros mamíferos, como murinos e caninos (ENGLISH *et al.*, 2007; PRASANNA *et al.*, 2010; YAN; ZHENG; XU, 2018; YANG *et al.*, 2018a, 2018b, 2016). Os relatos contemplam tratamentos de 6, 24 e até 72 horas, com diversidade de concentrações (2, 5, 7,5, 10, 15, 20 e 100 ng/mL) e formulações de meio de cultura.

Utilizando UC-MSC humanas, Yang *et al.* (2018) e Prasanna *et al.* (2010) demonstraram, respectivamente, que o tratamento com 20 e 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  após 72 horas resulta em acréscimos de 2 a 3 vezes COX-2/PGE2, dosados pelas técnicas de qPCR e ELISA. Yang utilizou como meio base D-MEM/F12 suplementado com 10% SFB e Prasanna, KO-D-MEM 10%SFB. Nossa proposta é a primeira a investigar esta abordagem em UC-MSC no meio base  $\alpha$ -MEM 10% PHCS, e observamos acréscimos de 3 a 5 vezes na expressão de COX-2. Acreditamos que a maior expressão observada em nossos resultados foi decorrente de uma concentração mais alta de citocina. Também podemos afirmar que a formulação  $\alpha$ -MEM 10% PHCS possibilita estratégias de *priming*.

Como dito anteriormente, o *priming* é uma estratégia de modulação do mecanismo biológico de interesse. Logicamente, ele se reflete na modulação dos níveis de proteínas. Em geral, o monitoramento deste processo de regulação é feito

com o sistema de gene repórter. Neste caso, associa-se a proteína alvo a outra facilmente expressa, como luciferase, beta-galactosidase ou *green fluorescent protein* (GFP). Este sistema deve ter linhagens celulares modificadas com construção gênica capaz de diferenciar nitidamente entre alvo e artefato. A quantificação dos níveis de mRNA por qPCR se mostra direta, prática e de fácil implementação em comparação ao sistema gene repórter (BARDELLE *et al.*, 2015; BITTKER, 2012).

O fluxo de trabalho para obtenção de amostras de mRNA para análises de qPCR segue em duas vertentes: *one-step* e *two-steps*. Na abordagem *one-step*, o extrato de RNA total obtido segue para uma reação única, na qual ele é convertido em cDNA e posteriormente amplificado na presença de uma sonda de hidrólise. Para *two-steps*, há uma primeira reação onde uma quantidade pré-definida de RNA é convertida em cDNA, e outra reação na qual o cDNA é amplificado. O protocolo *one-step* padronizado implica em uma menor manipulação e o uso de um reduzido volume de amostra. No entanto, o RNA é uma molécula com menor estabilidade, e cada ciclo de descongelamento para o uso na reação pode comprometer sua integridade. Logo, é vantajoso o *two-steps* pois permite a conversão do RNA em cDNA garantindo a estocagem e a utilização da amostra para mais de uma análise (BITTKER, 2012; LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Nós optamos conduzir nossa análise em *two-steps* justamente pelas vantagens supracitadas. Em nossa reação de qPCR, utilizamos o método *Comparative Ct* ( $\Delta\Delta Ct$ ) para análise dos dados. Este método exige que o comportamento do gene alvo seja semelhante ao do endógeno para determinar se há alteração nos níveis de expressão gênica. No estudo do comportamento das sondas COX-2 e B2M para a triagem, foram usados dois fatores de diluição: 1:2 e 1:5. Os resultados apontaram que em uma diluição de 5 vezes, os valores de eficiência e a inclinação da reta foram similares entre as duas sondas. A otimização dos resultados de eficiência em 1:5 deve-se ao maior fator de diluição. Ao diluir as amostras, diminui-se também a influência de inibidores, derivados do processo de extração, sobre a ação da polimerase ou interferência deles na relação da sonda com o material genético (Thermofisher Scientific, 2022).

De acordo com instruções do fabricante, a eficiência de uma sonda deve ser de 90 a 100%. Isto garante que a polimerase trabalhe em sua capacidade máxima, garantindo que material genético presente seja duplicado a cada ciclo e que o número de cópias do gene possa ser determinado com maior exatidão (Thermofisher

Scientific, 2022). Neste estudo, a sonda de hidrólise para B2M está dentro do intervalo indicado pelo fabricante, e a de COX-2, não. Isto indica que, ao longo dos 40 ciclos, a reação de amplificação de COX-2 teria menor sensibilidade de detecção.

Na análise estatística que compara os dados de qPCR dos tratamentos controle TNF- $\alpha$  e DMSO 0,5%, o teste de Mann-Whitney aponta como significativa a diferença entre eles, indicando assim a modulação do mRNA de COX-2. Contudo, observando a distribuição das replicatas em cada tratamento controle, vemos que os dados de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  TNF- $\alpha$  apresentam-se uniformemente distribuídos ao redor do valor médio. Já no tratamento com DMSO, há uma distribuição heterogênea nos valores de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Grande parte dos dados estão abaixo do valor médio e outros flutuam próximos e acima da média. Estes inclusive alcançam valores próximos a algumas replicatas de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  TNF- $\alpha$ .

De acordo com Bittker *et al.* (2012), a grande dificuldade em triagens é a alta variabilidade encontrada no controle negativo, podendo reduzir a sensibilidade do teste e aumentar a faixa de falso-positivos. De acordo com os autores, esta variabilidade seria decorrente do preparo de amostra. Para diminuir a variabilidade, os autores sugerem o preparo de lotes de células na mesma passagem destinados a triagem e a padronização para extração de RNA total, com destaque às etapas de lavagem e lise, pois refletem na síntese e qualidade do cDNA.

Nas análises de qPCR feitas ao longo da nossa proposta, foi utilizado o RNA total extraído tanto por kit comercial (RNeasy mini kit) quanto pela extração automatizada. Os resultados associados a extração pelo kit comercial (Figuras 3, 4 e 13) nos mostram diferença de 3 a 5 vezes entre o  $2^{-\Delta\Delta CT}$  TNF- $\alpha$  e DMSO. Na extração automatizada (Figuras 9 e 10), observam-se diferenças de aproximadamente 1,3 a 1,8. Isto sugere que um RNA total obtido pelo kit comercial apresentaria melhor qualidade para as reações. No entanto, vale ressaltar que é impossível conduzir uma triagem em larga escala com kits de extração manuais, e que a melhor decisão seria otimizar o processo automatizado para melhorar a qualidade da amostra.

Para a seleção de alvos, utilizou-se a estratégia de Yang *et al.* (2016) com modificações. Os autores observaram a distribuição de dados obtidos na triagem e os compararam com o valor médio do controle positivo mais três desvios padrão. Baseado nisso, nós estipulamos o valor limiar para a seleção de alvos somando o valor médio do  $\Delta\Delta CT$  TNF- $\alpha$  (1,25) mais 3 valores de desvio ( $0,32 \times 3 = 0,96$ ) resultando em 2,21. O mesmo raciocínio foi feito para triagem secundária, com valor limiar de

2,77. Na triagem primária, foram detectados 53 alvos dentre 590 amostras, e na triagem secundária, apenas 1 alvo dentro de 53 moléculas.

Bittker *et al.* (2012) e Zhang *et al.* (2011) indicam a avaliação da robustez do ensaio pelo *Z score* ou *MAD score*. Estas avaliações levam em consideração as médias dos controles positivo e negativo, e seus respectivos desvios. A qualidade do ensaio aumenta proporcionalmente à distância entre a distribuição do controle positivo e negativo. A avaliação do nosso ensaio por esses critérios indica robustez baixa devido a sobreposição dos controles (dados não mostrados). Contudo, as análises de seleção de amostra por ELISA, qPCR e WB mostraram o potencial do eixo TNF- $\alpha$  – DMSO sobre a modulação de COX-2, e este eixo, aliado a análise por distribuição de dados, demonstrou que foi possível a seleção de amostras.

Em se tratando do uso da triagem em larga escala com MSC, há relatos de seleção de populações pré-dispostas à diferenciação através de marcadores de superfície, da busca de compostos que regulem a diferenciação osteogênica e condrogênica, ou que promovam angiogênese e neurogênese (ALVES *et al.*, 2011; BARA *et al.*, 2015; BREY *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2008; LO CICERO *et al.*, 2016; MARCHESI *et al.*, 2020; WALMSLEY *et al.*, 2015).

No caso da potencialização da imunomodulação em MSC, Yang *et al.* (2016) triaram uma biblioteca constituída por 1.402 compostos aprovados pela US Food and Drug Administration (FDA), utilizando a técnica de HTRF (*homogeneous timing-resolved fluorescence*): uma abordagem na qual são utilizados anticorpos conjugados a um fluoróforo para identificar moléculas no sobrenadante. Os autores identificaram a tetrandrina, um alcaloide isolado de plantas e empregado na medicina chinesa no tratamento de doenças circulatórias. O tratamento com tetrandrina nas concentrações de 5-10  $\mu$ M induziu a produção de PGE2 pelas BM-MSCs após 48 horas numa via metabólica canônica dependente de NF- $\kappa$ B e COX-2. As BM-MSCs tratadas com o composto demonstraram maior capacidade moduladora *in vitro* e *in vivo* em comparação com as não tratadas. Esta molécula foi então reposicionada como moduladora da produção de PGE2 em BM-MSCs.

Em se tratando do *priming* com produtos naturais, tem-se o uso de pirogalol, um polifenol isolado de vegetais e frutas. Ele é capaz de induzir uma modulação positiva do fator de transcrição Nfr2 em UC-MSCs, resultando no aumento de proteínas que diminuem o estresse oxidativo, a inflamação e a apoptose em células epiteliais em síndromes respiratórias (ZHANG *et al.*, 2022).

Em nosso trabalho, foi proposta a triagem em larga escala por qPCR de uma biblioteca NIH com 707 compostos para seleção de moléculas moduladoras do eixo TNF- $\alpha$  – COX-2 utilizando UC-MSC isoladas e cultivadas em condições *xeno-free*. A triagem e os resultados de validação apontaram a molécula indirubina. Os resultados preliminares mostram que com 50  $\mu$ M e após 72 horas de tratamento, a molécula modula de forma positiva a expressão gênica e proteica de COX-2.

A indirubina é um produto natural obtido do macerado de folhas ou gemas das plantas *Folium Isatidis* e *Radix Isatidis*. É apontada em publicações como molécula antitumoral e anti-inflamatória. No segundo caso, a indirubina e seus derivados modulariam negativamente mecanismos pró-inflamatórios em células do sistema imunológico, como por exemplo JAK3/STAT3, responsável pela expressão de IL-1, IL-6, IL-17 e IL-22. Em macrófagos, a indirubina também pode diminuir a fosforilação de I $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ , impedindo que eles se liguem ao NF $\kappa$ B e assim retardando a produção de fatores pró-inflamatórios como COX-2, sintase de óxido nítrico induzível, IL-6 e IL-1 $\beta$  (KIM; PARK, 2012; XIE *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2022).

Interessantemente, em modelo animal de mastite induzidos por lipopolissacarídeos (LPS), as concentrações de indirubina utilizadas para ação anti-inflamatória foram de 25, 50 e 100  $\mu$ M (LAI *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2022). Lai *et al.* (2017) observaram que estas concentrações de indirubina modularam negativamente a ativação do NF- $\kappa$ B via ligação *toll like receptor 4* (TLR-4) e LPS, e diminuíram a expressão de fatores pró-inflamatórios em células epiteliais da mama.

Em nosso trabalho, observamos modulações positivas entre 25 e 50  $\mu$ M de indirubina. Adicionalmente, nosso resultado de curva de dose-resposta sugere futuras avaliações de doses maiores, como por exemplo, 100  $\mu$ M. Quando alinhamos os achados de Lai *et al.* (2017), Yang *et al.* (2016) e os nossos resultados, podemos elaborar duas conclusões. Uma delas seria de que a redução da inflamação no modelo de mastite poderia ser tanto pela ação negativa em NF- $\kappa$ B em células do sistema imunológico quanto pela ação positiva nas MSC presentes *in vivo* que, ao serem primadas pela molécula, iniciariam o processo de imunomodulação. A outra, seria de que o mecanismo de modulação de COX-2 em MSC pela indirubina acontece pela via de NF- $\kappa$ B, assim como na tetrandrina. Desta forma, futuros experimentos devem investigar o papel de NF- $\kappa$ B na modulação de COX-2 via indirubina.

Em nosso resultado preliminar de ensaio de co-cultivo na presença de indirubina foi observado um efeito contrário. O tratamento com indirubina aparentou

não conter a proliferação dos linfócitos em comparação ao controle e ao DMSO. Como ressaltado no tópico de resultados, trata-se de um experimento e foi avaliada uma única abordagem. Adicionalmente, deve-se levar em conta que antes de ser feito um estudo de cinética para determinar com clareza quando começa e quando termina o efeito da indirubina. Yang *et al.* (2016) observou a secreção a cada 24h de PGE2 em BM-MSC tratadas com tetrandrine por três dias e concluiu que o efeito durou somente em 48 horas. Outro fator a ser considerado, é o contato célula-célula. No co-cultivo MSC e PBMC são colocados em contato direto e este fator pode mascarar a atividade parácrina da PGE2 induzida pela indirubina. Ng *et al.* (2016) compara a imunomodulação de MSC em contato célula-célula e sem contato utilizando *transwells*. Os autores mostram que o contato célula é mais efetivo, no entanto, é notável a modulação da proliferação de PBMC pela atividade parácrina. Dentro do contexto do contato indireto das populações celulares deve-se ponderar também o papel funcional das vesículas extracelulares provenientes de MSC na diminuição da proliferação e atenuação do perfil secretório pró-inflamatório de linfócitos T efetores (MONGUIÓ-TORTAJADA *et al.*, 2017).

Embora estratégias de *priming* sejam amplamente publicadas, poucos ensaios clínicos relatam a aplicação de MSC previamente condicionadas (NAJAR *et al.*, 2022). Entre exemplos, tem-se: (i) BM-MSC autólogas tratadas com meio base suplementado com moléculas humanas que induzem as células a se pré-diferenciarem em progenitores neuronais para tratamento de esclerose lateral amiotrófica; (ii) o uso de LP para condicionar BM-MSC autólogas para infusão em pacientes com osteoartrose de joelho; (iii) o cultivo em hipóxia de BM-MSC alogênicas para intervenções em enfisema pulmonar severa; E por fim, (iv) infusões UC-MSC primadas com medicamentos antirreumáticos como terapia para artrite reumatoide. Todos estes ensaios se encontram em fase I/II, indicando segurança e eficácia na dose de infusão de mesenquimais (AL-NAJAR *et al.*, 2017; BERRY *et al.*, 2019; GOTHELF *et al.*, 2014; NAJAR *et al.*, 2022; OH; KIM; OH, 2017; WANG *et al.*, 2019). Além disso, este conjunto de dados reforça que, apesar de poucas abordagens, a estratégia de MSC condicionadas é promissora.

O uso majoritário das MSC em ensaios clínicos é como terapia de segunda linha ao GvHD. No estudo de Zhao *et al.* (2019), foram levantados dados sobre a eficácia das MSC como tratamento e prevenção a esta doença. Os autores destacaram que as MSC mais empregadas foram BM-MSC e a UC-MSC. Eles

reportaram em sua metanálise que pacientes tratados com UC-MSC reduzem a incidência de GvHD crônico e aumentam a enxertia de neutrófilos. Apesar de não ser significativo na análise, as UC-MSC também diminuíram a chance de recidiva no paciente.

Embora a BM-MSC seja o padrão ouro entre as MSC, nota-se em publicações e nos ensaios clínicos a substituição natural dela pela UC-MSC. Estas células emergem como novo produto da terapia celular devido a fatores como: (i) a coleta de cordão umbilical ser indolor e não invasiva ao doador; (ii) o maior rendimento no processo de isolamento; (iii) a alta proliferação e menor senescência, por provenir de fonte neonatal; e (iv) evidências de que o potencial parácrino e de endereçamento a locais de lesão seja superior em comparação a BM-MSC (BARTOLUCCI et al., 2017; CHEN et al., 2019a; KIM et al., 2019; PATEL et al., 2013; WINTERS et al., 2016; ZHANG et al., 2022).

Entre os nossos objetivos está a padronização de um modelo de GvHD para avaliar futuramente a eficácia da UC-MSC pré-tratadas com indirubina em comparação àquelas não tratadas. Nós optamos em seguir o modelo de Jang *et al.* (2014), baseado em irradiação de corpo total e xenotransplante. Os autores relataram que, com dose de irradiação de 2 Gy e infusão de  $1 \times 10^6$  PBMC, foi possível observar sintomas dentro de 21-24 dias e média de sobrevivência de  $41,6 \pm 7$  dias. Com a mesma dose de irradiação e aplicando  $2,5 \times 10^6$  PBMC, os pesquisadores relataram sintomas dentro de 15 a 20 dias e a média de sobrevivência de  $24 \pm 10$  dias.

Na nossa abordagem, foi observado uma alta letalidade dos tratamentos. Em menos de 15 dias, todos os animais morreram. Ao que tudo indica, nossos animais foram mais sensíveis ao tratamento com irradiação do que os usados por Jang *et al.* (2014). De acordo com o fornecedor de animais The Jackson Laboratory, a linhagem NSG (referência 005557) é extremamente sensível a irradiação de corpo total. O fornecedor indica que o animal suporta até 4 Gy (SHULTZ et al., 2005). Contudo, nossos achados apontam para lesão por irradiação.

A radiação impacta muitos órgãos, mas a falha hematopoiética é a mais comum mesmo em pequenas doses. Doses mais altas levam a pancitopenia e lesões no epitélio gastrointestinal, resultando em maior número de infecções e perda rápida de peso (DIAZ et al., 2020). Não foram encontradas alterações no intestino dos animais e nem indícios de infecções, mas observou-se perda de peso e alterações de cor durante a biópsia do fígado.

No artigo de Diaz *et al.* (2020) é descrito que a infusão única de  $0,3 \times 10^6$  BM- MSC humanas em um período de 3 a 30 horas após o tratamento radiação melhora a sobrevivência de animais com lesões de irradiação. Os autores ressaltam que os parâmetros hematológicos, a frequência de células tronco hematopoiéticas e progenitores entram em colapso após a irradiação. No entanto, a infusão de BM- MSC prolonga a vida dos animais dando a chance de o sistema hematológico regenerar-se. Os resultados do nosso segundo experimento com adição do lavado medular concordam plenamente com os achados de Diaz. Nossos animais têm taxa de sobrevivência maior que 30 dias e comportamento e peso equiparável ao da condição controle. Estes achados reiteram a conclusão dos nossos resultados preliminares de que é possível a otimização do modelo animal de GvHD com a adição do lavado medular.

## 6. Conclusão

O uso de UC-MSC cultivadas em meio *xeno-free* em combinação com a estratégia *priming* do eixo TNF $\alpha$ -COX-2 permitiu a elaboração de um ensaio de qPCR em larga escala para a seleção de moléculas moduladoras de COX-2. Os resultados apontaram para o produto natural indirubina. Esta molécula nas concentrações de 25 a 50  $\mu$ M modulam positivamente a expressão gênica e proteica de COX-2. No entanto, ainda necessário determinar o nível de resposta da célula frente a este estímulo, e como isso poderia se refletir funcionalmente na propriedade imunomoduladora. Por fim, não há dados sobre o efeito da indirubina sobre as características fenotípicas de uma MSC, abrindo um novo campo a se explorar.

## Referências Bibliográficas

ABU KASIM, N. H. et al. Unique molecular signatures influencing the biological function and fate of post-natal stem cells isolated from different sources. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, n. 12, p. E252–E266, dez. 2015.

AL-NAJAR, M. et al. Intra-articular injection of expanded autologous bone marrow mesenchymal cells in moderate and severe knee osteoarthritis is safe: A phase I/II study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2017.

ALBESIANO, E. et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: Expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood*, v. 102, n. 9, p. 3333–3339, 2003.

ALVES, H. et al. High-throughput assay for the identification of compounds regulating osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, 2011.

ARUTYUNYAN, I. et al. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells International*, v. 2016, p. 1–17, 2016.

BARA, J. J. et al. High content and high throughput screening to assess the angiogenic and neurogenic actions of mesenchymal stem cells in vitro. *Experimental Cell Research*, v. 333, n. 1, p. 93–104, 2015.

BARDELLE, C. et al. Validation of Miniaturized One-Step Reverse Transcription qPCR Assays for High-Throughput Screening and Comparison to a Reporter Gene Methodology. *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 13, n. 2, p. 94–101, mar. 2015.

BARTOLUCCI, J. et al. Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: A phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [Randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal]. *Circulation Research*, v. 121, n. 10, p. 1192–1204, 2017.

BARTOSH, T. J. et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their anti-inflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 31, p. 13724–13729, 2010.

BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, v. 13, n. 4, p. 392–402, 2013.

BERRY, J. D. et al. NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS. *Neurology*, v. 93, n. 24, p. e2294–e2305, 10 dez. 2019.

BITTKER, J. A. High-Throughput RT-PCR for Small-Molecule Screening Assays. *Current Protocols in Chemical Biology*, v. 4, n. 1, p. 49–63, 15 mar. 2012.

BOIERI, M. et al. The role of animal models in the study of hematopoietic stem cell transplantation and GvHD: A historical overview. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. AUG, 2016.

BOLLYKY, P. L. et al. Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *n. December 2009*, p. 211–220, 2010.

BONGSO, A.; FONG, C.-Y. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cell reviews*, v. 9, n. 2, p. 226–40, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BREY, D. M. et al. High-throughput screening of a small molecule library for promoters and inhibitors of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 1, p. 163–174, 2011.

BRUNNER, D. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*, v. 27, n. 1, p. 53–62, 2010.

BUI, H. T. H.; NGUYEN, L. T.; THAN, U. T. T. Influences of Xeno-Free Media on Mesenchymal Stem Cell Expansion for Clinical Application. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 18, n. 1, p. 15–23, 2021.

CHEN, X. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing heme oxygenase-1 ameliorate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 5, p. 7301–7319, 2019a.

CHEN, Y.-C. et al. Can mesenchymal stem cells and their conditioned medium assist inflammatory chondrocytes recovery? *PLOS ONE*, v. 13, n. 11, p. e0205563, 21 nov. 2018.

CHEN, Y.-T. et al. The superiority of conditioned medium derived from rapidly expanded mesenchymal stem cells for neural repair. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 10, n. 1, p. 390, 16 dez. 2019b.

CHINNADURAI, R. et al. Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFN $\gamma$  Licensing. *Stem Cells*, v. 34, n. 9, p. 2429–2442, 1 set. 2016.

CIMINO, M. et al. Xeno-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem cells international*, v. 2017, p. 6597815, 2017.

COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, v. 36, n. 9, p. 1179–83, 2003.

COVAS, D. T. et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Experimental cell research*, v. 309, n. 2, p. 340–4, 2005.

CRUZ, D. J. M. et al. High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 2, 2013.

DE LIMA PRATA, K. et al. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. *Cytotherapy*, v. 14, n. July 2011, p. 1–7, 2012.

DE WITTE, S. F. H. et al. Cytokine treatment optimises the immunotherapeutic effects of umbilical cord-derived MSC for treatment of inflammatory liver disease. *Stem cell research & therapy*, v. 8, n. 1, p. 140, 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DORRONSORO, A. et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Bone Marrow Research*, v. 2013, p. 1–8, 2013a.

DORRONSORO, A. et al. Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. v. 2013, 2013b.

DOS SANTOS, D. F. et al. Non-cytotoxic 1,2,3-triazole tethered fused heterocyclic ring derivatives display Tax protein inhibition and impair HTLV-1 infected cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 28, n. 22, p. 115746, nov. 2020.

DOS SANTOS, V. T. M. et al. Characterization of Human AB Serum for Mesenchymal Stromal Cell Expansion. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 44, n. 1, p. 11–21, 2017.

DOTOLI, G. M. et al. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, n. September 2016, p. 1–4, 2017.

DUNAVIN, N. et al. Mesenchymal Stromal Cells: What Is the Mechanism in Acute Graft-Versus-Host Disease? *Biomedicines*, v. 5, n. 3, p. 39, 2017.

EL OMAR, R. et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 20, n. 5, p. 523–544, 2014.

ENGLISH, K. et al. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*, v. 110, n. 2, p. 91–100, jun. 2007.

ENTZEROTH, M.; FLOTOW, H.; CONDRON, P. Overview of high-throughput screening. *Current Protocols in Pharmacology*, n. SUPPL. 44, p. 1–27, 2009.

FONG, C. Y. et al. Human Wharton's Jelly Stem Cells Have Unique Transcriptome Profiles Compared to Human Embryonic Stem Cells and Other Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES. *Transplantation*, v. 17, n. 4, p. 331–340, abr. 1974.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 2001.

GALVÃO, A. F. et al. Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 408, n. 13, p. 3613–3623, 2016.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*, v. 7, p. e2062, 2016.

GOTHELF, Y. et al. Safety of repeated transplantations of neurotrophic factors-secreting human mesenchymal stromal stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, v. 3, n. 1, p. 1–11, 10 dez. 2014.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.

HAJARE, A. A. et al. Review on: High-throughput screening is an approach to drug discovery. v. 4, n. 1, p. 112–129, 2013.

HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, v. 23, n. 3, p. 144–150, 2002.

HOFFMANN, A. et al. Comparison of in vitro -cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 4, n. 7, p. 524–531, 2016.

HOMBACH, A. A. et al. IL7-IL12 Engineered Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improve A CAR T Cell Attack Against Colorectal Cancer Cells. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 873, 3 abr. 2020.

HUANG, A. H. et al. High-throughput screening for modulators of mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 36, n. 11, p. 1909–1921, 2008.

HYLAND, M. et al. Pro-Inflammatory Priming of Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Alters the Protein Cargo of Their Extracellular Vesicles. *Cells*, v. 9, n. 3, p. 726, 16 mar. 2020.

HYNES, K. et al. Generation of Functional Mesenchymal Stem Cells from Different Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem cells and development*, v. 00, n. 00, p. 1–13, 2014.

IN 'T ANKER, P. S. et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*, v. 22, n. 7, p. 1338–1345, 2004.

JANG, Y. K. et al. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy*, v. 16, n. 3, p. 298–308, 2014.

KARAHUSEYINOGLU, S. et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem cells*, v. 25, p. 319–331, 2007.

KIM, H.-S. et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF- $\beta$ 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, v. 33, n. 4, p. 1254–66, abr. 2015.

KIM, J.-K.; PARK, G.-M. Indirubin-3-monoxime exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF- $\kappa$ B and JNK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. *Inflammation Research*, v. 61, n. 4, p. 319–325, 21 abr. 2012.

KIM, K. et al. Human mesenchymal stem cell sheets in xeno-free media for possible allogenic applications. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, v. 99, p. 62–68, abr. 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAI, J.-L. et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*, v. 40, n. 1, p. 1–12, 7 fev. 2017.

LAM, A. T.-L. et al. Biodegradable poly- $\epsilon$ -caprolactone microcarriers for efficient production of human mesenchymal stromal cells and secreted cytokines in batch and fed-batch bioreactors. *Cytotherapy*, v. 19, n. 3, p. 419–432, mar. 2017.

LAM, A. T.-L. et al. Multiomics analyses of cytokines, genes, miRNA, and regulatory networks in human mesenchymal stem cells expanded in stirred microcarrier-spinner cultures. *Stem Cell Research*, v. 53, p. 102272, maio 2021.

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

LI, D. et al. All-Trans Retinoic Acid Improves the Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on the Treatment of Ankylosing Spondylitis: An In Vitro Study. v. 2015, 2015.

LI, M. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars. *International Wound Journal*, v. 14, n. 1, p. 64–73, fev. 2017.

LIFE TECHNOLOGIES. Real-time PCR handbook. [s.l: s.n.].

LIM, J. et al. Valproic acid enforces the priming effect of sphingosine-1 phosphate on human mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 40, n. 3, p. 739–747, set. 2017.

LO CICERO, A. et al. A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, v. 6, n. April, p. 1–11, 2016.

MARCHESE, P. et al. A Novel High-Throughput Screening Platform Identifies Itaconate Derivatives from Marine *Penicillium antarcticum* as Inhibitors of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Marine Drugs*, v. 18, n. 4, p. 192, 5 abr. 2020.

MCELREAVEY, K. D. et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society Transactions*, v. 19, n. 1, p. 29S-29S, 1 fev. 1991.

MEIRELLES, L. D. S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 20, n. 5–6, p. 419–27, 2009.

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

MENG, X. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing IL10 attenuates cardiac impairments in rats with myocardial infarction. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 1, p. 587–595, 19 jan. 2018.

MIZUKAMI, A. et al. Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnology Journal*, v. 11, n. 8, p. 1048–1059, ago. 2016.

MONGUIÓ-TORTAJADA, M. et al. Nanosized UCMSC-derived extracellular vesicles but not conditioned medium exclusively inhibit the inflammatory response of stimulated T cells: implications for nanomedicine. *Theranostics*, v. 7, n. 2, p. 270–284, 2017.

MUNNEKE, J. M. et al. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature. *Transplantation*, v. 100, n. 11, p. 2309–2314, 2016.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*, v. 45, n. 11, p. e54, 2013.

NAJAR, M. et al. Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Value, Challenges and Optimization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, n. January, 14 jan. 2022.

NAKAJIMA, M. et al. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, v. 6, n. September, p. 102–111, set. 2017.

National Center for Advancing Translation Sciences (NCATS). Compound Management. Disponível em: <https://ncats.nih.gov/preclinical/core/compound>. Acesso em: 16 nov. 2022.

NG, J. et al. Immunomodulatory Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 2853, n. May, p. 2844–2853, 2016.

NORONHA NC, N. D. C. et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2019.

OH, D. K.; KIM, Y.-S.; OH, Y.-M. Lung Regeneration Therapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, v. 80, n. 1, p. 1, 2017.

OIKONOMOPOULOS, A. et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: The effects of animal/xeno-free media. *Scientific Reports*, v. 5, n. June, p. 1–11, 2015.

PATEL, A. N. et al. Mesenchymal stem cell population isolated from the subepithelial layer of umbilical cord tissue. *Cell Transplantation*, v. 22, n. 3, p. 513–519, 2013.

PITTENGER, M. F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine*, v. 4, n. 1, p. 22, 2 dez. 2019.

PRASANNA, S. J. et al. Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS ONE*, v. 5, n. 2, 2010.

PROCKOP, D. J. Concise Review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *STEM CELLS*, v. 31, n. 10, p. 2042–2046, out. 2013.

QIU, Y. et al. TLR3 preconditioning enhances the therapeutic efficacy of umbilical cord mesenchymal stem cells in TNBS-induced colitis via the TLR3-Jagged-1-Notch-1 pathway. *Mucosal Immunology*, v. 10, n. 3, p. 727–742, 21 maio 2017.

REDONDO-CASTRO, E. et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, n. 1, p. 79, 17 dez. 2017.

ROBB, K. P. et al. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytotherapy*, v. 21, n. 3, p. 289–306, mar. 2019.

ROELOFS, H. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, v. 371, n. 9624, p. 1579–1586, 2008.

ROVIRA GONZALEZ, Y. I. et al. In vitro cytokine licensing induces persistent permissive chromatin at the Indoleamine 2,3-dioxygenase promoter. *Cytotherapy*, v. 18, n. 9, p. 1114–1128, set. 2016.

RYAN, J. M. et al. Interferon- $\gamma$  does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 149, n. 2, p. 353–363, 2007.

SABAPATHY, V.; KUMAR, S. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. XX, n. X, p. 1–18, 2016.

SAGARADZE, G. et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 7, p. 1656, 3 abr. 2019.

SAKATA, D.; YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2, an immunoactivator. *Journal of pharmacological sciences*, v. 112, n. 1, p. 1–5, 2010.

SANGIORGI, B. et al. DSP30 enhances the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells and protects their suppressive potential from lipopolysaccharide effects: A potential role of adenosine. *Cytotherapy*, v. 18, n. 7, p. 846–859, 2016.

SCHROEDER, M. A.; DIPERSIO, J. F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Disease models & mechanisms*, v. 4, n. 3, p. 318–33, 2011.

SHEKARAN, A. et al. Enhanced in vitro osteogenic differentiation of human fetal MSCs attached to 3D microcarriers versus harvested from 2D monolayers. *BMC Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 102, 31 dez. 2015.

SHIN, T.-H. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 2, p. 244, 25 jan. 2017.

SHULTZ, L. D. et al. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R  $\gamma$  null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 10, p. 6477–6489, 15 maio 2005.

SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells : An Update . *PubMed Commons. Cell Transplantation*, v. 25, p. 829–848, 2016.

SRINIVASAN, A. et al. Strategies to enhance immunomodulatory properties and reduce heterogeneity in mesenchymal stromal cells during ex vivo expansion. *Cytotherapy*, v. 24, n. 5, p. 456–472, maio 2022.

SUNDIN, M. et al. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone marrow transplantation*, v. 37, n. 11, p. 1051–9, 2006.

SYPECKA, J.; SARNOWSKA, A. Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors. *Life Sciences*, v. 139, p. 24–29, 2015.

TERESA CONCONI, M. Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, v. 4, n. 1, p. 6–20, 2011.

ThermoFisher Scientific. Poor efficiency of PCR. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html> . Acesso em: 16 nov. 2022

TESHIMA, T. et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nature Medicine*, v. 8, n. 9, p. 1039–1039, set. 2002.

THEISS-SUENNEMANN, J. et al. Glucocorticoids attenuate acute graft-versus-host disease by suppressing the cytotoxic capacity of CD8 + T cells. *The Journal of Pathology*, v. 235, n. 4, p. 646–655, mar. 2015.

TOZETTI, P. A. et al. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. *Biotechnology Progress*, v. 33, n. 5, p. 1358–1367, 9 set. 2017.

TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. *Stem Cells*, v. 26, n. 3, p. 591–599, mar. 2008.

VANGSNESS, C. T.; STERNBERG, H.; HARRIS, L. Umbilical Cord Tissue Offers the Greatest Number of Harvestable Mesenchymal Stem Cells for Research and Clinical Application: A Literature Review of Different Harvest Sites. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, v. 31, n. 9, p. 1836–1843, 2015.

VILLA-DIAZ, L. G. et al. Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells Cultured on Synthetic Substrates. *STEM CELLS*, v. 30, n. 6, p. 1174–1181, jun. 2012.

WALKER, J. M. et al. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 698

WALMSLEY, G. G. et al. High-Throughput Screening of Surface Marker Expression on Undifferentiated and Differentiated Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue engineering. Part A*, v. 21, n. 15–16, p. 2281–91, ago. 2015.

WANG, H.-S. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 2004.

WANG, L. et al. Efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for rheumatoid arthritis patients: A prospective phase I/II study. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 13, p. 4331–4340, 2019.

WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, v. 15, n. 11, p. 1009–1016, 20 out. 2014.

WATERMAN, R. S. et al. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS ONE*, v. 5, n. 4, p. e10088, 26 abr. 2010.

WINTERS, A. A. et al. Evaluation of multiple biological therapies for ischemic cardiac disease. *Cell Transplantation*, v. 25, n. 9, p. 1591–1607, 2016.

WOBMA, H. M. et al. Dual IFN- $\gamma$ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*, v. 1, n. 3, p. 45–56, mar. 2018.

XIAO, S. et al. IL-10 Gene-Modified Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Augment Regenerative Wound Healing by Multiple Synergistic Effects. *Stem Cells International*, v. 2019, p. 1–13, 11 jun. 2019.

XIE, X. et al. Indirubin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice by inhibiting inflammatory responses mediated by IL-17A-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Molecular Immunology*, v. 101, p. 386–395, set. 2018.

YAN, L.; ZHENG, D.; XU, R.-H. Critical Role of Tumor Necrosis Factor Signaling in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. July, p. 1658, 2018.

YANG, C. et al. The biological changes of umbilical cord mesenchymal stem cells in inflammatory environment induced by different cytokines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 446, n. 1–2, p. 171–184, 22 set. 2018a.

YANG, H. M. et al. Canine mesenchymal stem cells treated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  enhance anti-inflammatory effects through the COX-2/PGE2 pathway. *Research in Veterinary Science*, v. 119, n. April, p. 19–26, 2018b.

YANG, L. et al. Pharmacological properties of indirubin and its derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 151, p. 113112, jul. 2022.

YANG, Z. et al. Tetrandrine identified in a small molecule screen to activate mesenchymal stem cells for enhanced immunomodulation. *Scientific Reports*, v. 6, n. October 2015, p. 30263, 2016.

YIN, L. et al. Microfluidic label-free selection of mesenchymal stem cell subpopulation during culture expansion extends the chondrogenic potential: In vitro. *Lab on a Chip*, v. 18, n. 6, p. 878–889, 2018.

YIN, L. et al. Label-free separation of mesenchymal stem cell subpopulations with distinct differentiation potencies and paracrine effects. *Biomaterials*, v. 240, p. 119881, maio 2020.

YLÖSTALO, J. H. et al. Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Cultured as Spheroids are Self-activated to Produce Prostaglandin E2 that Directs Stimulated Macrophages into an Anti-inflammatory Phenotype. *STEM CELLS*, v. 30, n. 10, p. 2283–2296, 20 out. 2012.

ZHAO, L. et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 10, n. 1, p. 182, 21 dez. 2019.

ZHANG, X. D. Illustration of SSMD, z score, SSMD\*, z\* score, and t statistic for hit selection in RNAi high-throughput screens. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 16, n. 7, p. 775–785, 2011.

ZHANG, Y. et al. Pyrogallol enhances therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells against LPS-mediated inflammation and lung injury via activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 191, p. 66–81, out. 2022.

## Apêndice A - Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE  
RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ofício nº 1707/2018  
CEP/MGV

Ribeirão Preto, 05 de julho de 2018

**Prezados Senhores,**

O trabalho intitulado "**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE COMPOSTOS SINTÉTICOS INDUTORES DO EFEITO IMUNOMODULADOR EM CÉLULAS ESTROMAS MESENQUIMAIS**" - versão 2, de 16/05/2018, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Biorrepositório, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico — Cordão Umbilical — versão 1, de 16/05/2018 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido — Células mononucleares do sangue periférico — versão 2, de 16/05/2018, de acordo com o Processo HCRP nº 313/2018.**

**Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido — TCLE — apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido — TCLE — apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

**Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.** Atenciosamente.

DR<sup>a</sup>. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA  
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

DR<sup>a</sup>. SIMONE KASHIMA HADDAD

PÉRICLES NATAN MENDES DA COSTA (ALIJN0)

Fundação Hemocentro — Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário — Monte Alegre  
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP  
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440

(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br

[www.hcrp.usp.br](http://www.hcrp.usp.br)

## Apêndice B – Aceite da Comissão de Ética na Utilização de Animais.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



# A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Identificação e caracterização funcional de compostos sintéticos indutores do efeito imunomodulador em células estromais mesenquimais”*, registrado com o número do protocolo **189/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas**, envolvendo a produção, manutenção 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). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 27 de janeiro de 2020.

Colaboradores:

Rafaela Rossetti

Fernanda Ursoli Ferreira

Péricles Natan Mendes da Costa

Felipe Augusto Rós

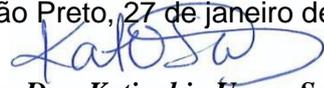
Simone Kashima Haddad

Cleide Lúcia Araújo Silva

**Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.**

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			27/01/2020 a 03/12/2025	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / NOD.Cg-Prkdscid Il2rgtm1Wjl/SzJ	196	25g / 60 dias	Macho	Laboratório de Estudos Experimentais em Animais

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2020



**Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**  
*Coordenadora da CEUA-FMRP-USP*

**Apêndice C - Lista de compostos citotóxicos (nomenclatura em inglês).**

## NIH1

- 01 - 5-Nonyloxytryptamine hydrochloride
- 02 - Diphenylcyclopropanone
- 03 - Digoxin
- 04 - Clomifene citrate
- 05 - Fluphenazine dihydrochloride
- 06 - Nortriptyline hydrochloride
- 07 - Vincristine sulfate
- 08 - Verapamil hydrochloride
- 09 - Mevastatin
- 10 - Fluvastatin
- 11 - Raloxifene hydrochloride
- 12 - Daunorubicin hydrochloride
- 13 - Fluoxetine hydrochloride
- 14 - Lovastatin
- 15 - Loperamide hydrochloride
- 16 - Telmisartan
- 17 - Cerivastatin sodium
- 18 - Prochlorperazine maleate
- 19 - Clofazimine
- 20 - Stanozolol
- 21 - Itraconazole
- 22 - Vindesine sulfate
- 23 - Amlodipine

## NIH2

- 01 - Griseofulvin
- 02 - Desipramine hydrochloride
- 03 - Ziprasidone
- 04 - 5-Azacytidine
- 05 - Quinacrine hydrochloride hydrate
- 06 - Artesunate
- 07 - Desloratadine
- 08 - Rifaximin
- 09 - Honokiol
- 10 - Topotecan hydrochloride
- 11 - Salmeterol
- 12 - Idarubicin hydrochloride
- 13 - Perphenazine
- 14 - Podofilox
- 15 - Thioridazine hydrochloride

- 16 - Albendazole
- 17 - Simvastatin
- 18 - Homoharringtonine
- 19 - Amoxapine
- 20 - Hydrocortisone hemisuccinate
- 21 - Flubendazole
- 22 - Nalidixic acid
- 23 - Mitoxantrone hydrochloride
- 24 - Troxipide
- 25 - Triptolide
- 26 - Tegaserod maleate
- 27 - Vinorelbine tartrate
- 28 - Sertraline hydrochloride

### NIH3

- 01 - Epirubicin hydrochloride
- 02 - Indatraline hydrochloride
- 03 - Trifluoperazine hydrochloride
- 04 - Prazosin hydrochloride hydrate
- 05 - Doxorubicin hydrochloride
- 06 - Paroxetine maleate
- 07 - Duloxetine hydrochloride
- 08 - Itavastatin calcium
- 09 - Maprotiline hydrochloride