



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado

Nádia de Cássia Noronha

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientado(a): Nádia de Cássia Noronha

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Kamilla Swiech

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 21/12/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2021

NORONHA,
N.C.

“ Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado”

Espaço de 2,5
cm reservado
para etiqueta de
localização da
biblioteca

DOUTORADO
FCFRPUSP
2021

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.

Noronha, Nádia de Cássia

“Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado”. Ribeirão Preto, 2021. 136 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador (a): Malmegrim de Farias, Kelen Cristina Ribeiro

Co-orientador(a): Swiech, Kamilla

1. células estromais mesenquimais; 2. biorreator; 3. microcarregador; 4. hipóxia; 5. IL-17; 6. potencial angiogênico; 7. potencial imunossupressor

FOLHA DE APROVAÇÃO

NORONHA, Nádia de Cássia

Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha amada mãe Fátima, pelo amor incondicional e por ser referência de luta, força e resiliência, e à minha querida e saudosa avó Lady (*in memoriam*), exemplo de trabalho e fé inabalável.

Agradecimentos especiais

À Profa. Dra. Kelen Malmegrim, orientadora e amiga, pela oportunidade, acolhimento e confiança, por todo aprendizado, apoio, estímulo e respeito.

À Profa. Dra. Kamilla Swiech, pela co-orientação, confiança e apoio neste projeto, pela oportunidade de todo aprendizado e discussões.

À Dra. Amanda Mizukami, mentora, por todo cuidado e carinho, atenção, ensinamentos, discussões e paciência.

À minha amada família, meus pais, José Carlos Noronha e Aparecida de Fátima Gouvêa Noronha, e minha querida irmã, Daniele C. Noronha, por todo amor, apoio, incentivo, encorajamento, luta. Meu alicerce, base de tudo o que eu sou e real motivo de todo meu esforço.

À toda minha grande família, em especial minha avó Djanira Cancian Gouvêa, e tias queridas, Ana Lúcia, Elivane e Antônia, que sempre me ajudaram em momentos difíceis desde o início dessa jornada.

Ao meu amado marido, Matheus Corrêa, pelo amor de todos esses anos, carinho, dedicação, companheirismo e apoio, pelos sonhos compartilhados, pelo amor com a minha família, por ser exatamente como é.

Agradecimentos

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP, que viabilizaram este estudo.

À Dra. Maristela Delgado Orellana do Laboratório de Terapia Celular (FUNDHERP), pela contribuição e parceria de sempre.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo (FUNDHERP), Patrícia, Rita, e especialmente à Camila, pela amizade, aprendizado e todas as contribuições que foram essenciais para este trabalho.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino (coordenadora do Lab. de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer FCFRP-USP), pela colaboração com as análises de autofagia, por toda boa vontade e atenção.

À Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro (coordenadora do Lab. de Hematologia FCFRP-USP), pela colaboração e apoio todos esses anos.

À Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues (coordenadora do Lab. de Imunologia Celular FMRP-USP), pela colaboração, trocas de ideias e discussões enriquecedoras durante nossas reuniões semanais do grupo de pesquisa.

Aos técnicos Luciana Ambrósio do Lab. de Hematologia FCFRP-USP e Luiz Fernando Chaim do Lab. de Terapia Celular FCFRP-USP, por toda eficiência e ajuda especialmente nessa etapa final.

Aos amigos do laboratório de Cultura Celular (FUNDHERP), onde desenvolvi todo o projeto e se tornou minha segunda casa, Mário Abreu, Rafael Biaggio e Tárík Heluy.

Aos amigos do grupo de pesquisa e que passaram pelo grupo, Lucas, Waldir, Rafaela, Maynara, Djúlio, João, Júlia e Renata, pela amizade, momentos alegres e incontáveis ensinamentos. Em especial Natália C. Dias dos Santos e Juçara Cominal, pela amizade e por todos ensinamentos compartilhados na bancada.

A todo grupo de funcionários do Hemocentro, em especial aos funcionários da manutenção e limpeza, que mantêm tudo funcionando e assim possibilitam nosso trabalho.

Aos meus queridos professores e educadores, em especial ao Prof. Rubens, Prof. Luís Paulo, Profa. Silvânia, Profa. Carina e Prof. Ailton, que plantaram a semente do amor pelos estudos e pela ciência.

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

“Não consigo conceber um Deus pessoal que tenha influência direta nas ações dos indivíduos ou que julgue as criaturas da sua própria criação. Minha religiosidade consiste numa humilde admiração pelo espírito infinitamente superior que se revela no pouco que conseguimos compreender sobre o mundo passível de ser conhecido. Essa convicção profundamente emocional da presença de um poder superior racional, que se revela nesse universo incompreensível forma a minha ideia de Deus”

Albert Einstein

RESUMO

NORONHA, N. C. **Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado**. 2021. 136f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As células estromais mesenquimais (MSC) têm sido usadas no tratamento de uma variedade de doenças devido ao seu notável potencial regenerativo, imunossupressor e imunomodulador. No entanto, muitos estudos clínicos revelaram resultados limitados, que têm levado pesquisadores à busca de estratégias que melhorem a eficácia terapêutica dessas células. É importante ressaltar que a aplicação clínica de MSC requer a implementação de bioprocessos de expansão celular escalonáveis combinados com condições de cultivo isentas de xenoantígenos. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar e avaliar funcionalmente células estromais mesenquimais de cordão umbilical (UC-MSC) expandidas em biorreator de tanque agitado, sob condições livre de xenoantígenos, pré-condicionadas ou não com hipóxia e/ou interleucina-17 (IL-17). Primeiramente, foi estabelecido um protocolo de expansão de UC-MSC em sistema de cultivo 3D, escalonável e livre de xenoantígenos, podendo ser concomitantemente pré-condicionadas. Os resultados demonstraram UC-MSC expandem eficientemente por cinco dias em sistema 3D agitado em condições de normóxia ou hipóxia usando microcarregadores revestidos de colágeno humano e meio suplementado com soro AB humano. UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D agitado e condição de hipóxia mantiveram o imunofenótipo, potencial de diferenciação e potencial imunossupressor *in vitro* característicos de MSC, comparadas às condições controles. Notavelmente, esta condição de cultivo aumentou significativamente as propriedades angiogênicas *in vitro* das UC-MSC. Em seguida, os efeitos dos pré-condicionamentos das UC-MSC com IL-17 combinado ou não com hipóxia foi avaliado. UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 e hipóxia apresentaram maior capacidade imunossupressora *in vitro*, comparadas às outras condições, porém sem diferença estatística. O pré-condicionamento das UC-MSC com IL-17 em condição de normóxia aumentou significativamente a secreção de CD147, molécula com funções imunossupressoras. O secretoma das UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D agitado e pré-condicionadas em condições de hipóxia apresentou grande número de proteínas pró-angiogênicas, anti-angiogênicas, citocinas pró-inflamatórias e pró-inflamatórias, fatores de crescimento, dentre outras. Por outro lado, o secretoma das UC-MSC expandidas da mesma forma, porém pré-condicionadas com IL-17/normóxia e IL-17/hipóxia apresentou uma significativa diminuição do número e/ou concentração de proteínas bioativas secretadas. Por fim, os resultados mostraram que UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D em biorreator de tanque agitado, independente do pré-condicionamento, apresentam concomitantemente “assinatura angiogênica” pela secreção de VEGF e TGF- β e “assinatura imunossupressora” pela secreção de PGE-2 e IDO, evidenciadas também pelos ensaios funcionais de angiogênese e inibição da proliferação de linfócitos, respectivamente.

Palavras-chave: células estromais mesenquimais; biorreator; microcarregador; hipóxia; IL-17; potencial angiogênico; potencial imunossupressor.

ABSTRACT

NORONHA, N. C. **Effects of preconditioning with hypoxia and/or interleukin-17 on umbilical cord mesenchymal stromal cells cultured in stirred tank bioreactor.** 2021. 136p. Thesis (Doctorate). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Mesenchymal stromal cells (MSC) have been used in the treatment of a variety of diseases due to their remarkable regenerative, immunosuppressive, and immunomodulatory potential. However, many clinical studies have revealed limited results, which have led researchers to search for strategies to improve their therapeutic efficacy. Importantly, the clinical application of MSC requires the implementation of scalable cell expansion bioprocesses combined with xenoantigen-free culture conditions. The general objective of this work was to characterize and functionally evaluate umbilical cord mesenchymal stromal cells (UC-MSC) expanded in a stirred tank bioreactor, under xenoantigen-free conditions, preconditioned or not with hypoxia and/or interleukin-17 (IL-17). Firstly, a UC-MSC expansion protocol was established in a scalable, xenoantigen-free, agitated 3D culture system, in which cells can be preconditioned at the same time. The results demonstrated that UC-MSC efficiently expands for five days in a stirred 3D culture system under conditions of normoxia or hypoxia using microcarriers coated with human collagen and medium supplemented with human AB serum. Expanded UC-MSC in a stirred 3D culture system, under hypoxia condition, maintained the immunophenotype, differentiation potential and *in vitro* immunosuppressive potential characteristic of MSC, compared to control conditions. Notably, this culture condition significantly increased the *in vitro* angiogenic properties of UC-MSC. Next, the effects of UC-MSC preconditioning with IL-17 combined or not with hypoxia was evaluated. UC-MSC preconditioned with IL-17 and hypoxia showed greater *in vitro* immunosuppressive capacity, compared to other conditions, but without statistical differences. The preconditioning of UC-MSC with IL-17 under normoxia significantly increased the secretion of CD147, a molecule with immunosuppressive functions. The secretome of UC-MSC expanded in stirred 3D culture system and preconditioned under hypoxic conditions presented a large number of pro-angiogenic, anti-angiogenic, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, growth factors, among others. On the other hand, the secretome of UC-MSC expanded in the same way but preconditioned with IL-17/normoxia and IL-17/hypoxia presented a significant decrease in the number and/or concentration of secreted bioactive proteins. Finally, our results showed that UC-MSC expanded in stirred 3D culture system, independent of preconditioning, presented concomitantly "angiogenic signature" by the secretion of VEGF and TGF- β and "immunosuppressive signature" by the secretion of PGE-2 and IDO, also evidenced by functional assays of angiogenesis and inhibition of lymphocyte proliferation, respectively.

Keywords: mesenchymal stromal cells; bioreactor; microcarriers; hypoxia; IL-17; angiogenic potential; immunosuppressive potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das abordagens de pré condicionamento/ priming de MSC mais utilizadas.....	34
Figura 2. Delineamento experimental.....	43
Figura 3. Perfil de crescimento das UC-MSC com o microcarregador SphereCol em condições livre de xenoantígenos.....	56
Figura 4. Expansão de UC-MSC em biorreator de tanque agitado pré-condicionadas ou não à hipóxia em condições livres de xenoantígenos.....	57
Figura 5. Imagens de UC-MSC cultivadas sob hipóxia com o microcarregador SphereCol em biorreator de tanque agitado após a coloração com DAPI.....	58
Figura 6. Imagens representativas das UC-MSC cultivadas em biorreator após coloração com o corante FDA.....	59
Figura 7. Recuperação celular das UC-MSC pós-cultivo em microcarregadores em biorreator de tanque agitado.....	60
Figura 8. Análise metabólica das UC-MSC expandidas em biorreator em condições livre de xenoantígeno em normóxia (DO 20%) e hipóxia (DO 5%) em 5 dias de cultivo.....	61
Figura 9. Perfil imunofenotípico das UC-MSC pré e pós-expansão e pré-condicionamento em biorreator de tanque agitado.....	62
Figura 10. Análise de multipotencialidade de UC-MSC previamente expandidas em biorreator em condição de hipóxia.....	63
Figura 11. Ensaio de migração de HUVEC tratadas com meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia.....	65
Figura 12. Imagens representativas do ensaio de potencial indutor da migração de HUVEC.....	66
Figura 13. Efeito do meio condicionado de UC-MSC expandidas/pré-condicionadas em biorreator na migração de HUVEC.....	67
Figura 14. Dinâmica do ensaio do potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de hipóxia.....	68
Figura 15. Imagens representativas de ensaio de potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de normóxia ou hipóxia.....	69
Figura 16. Potencial angiogênico dos meios condicionados de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de normóxia ou hipóxia.....	70
Figura 17. Potencial angiogênico de UC-MSC.....	71
Figura 18. Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo da inibição da proliferação de linfócitos T.....	73
Figura 19. Potencial de inibição da proliferação de linfócitos por UC-MSC cultivadas em biorreator.....	74
Figura 20. Expansão de UC-MSC em biorreator de tanque agitado e pré-condicionamento com Interleucina-17 em normóxia ou hipóxia.....	76
Figura 21. Imagens representativas das UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 e hipóxia (<i>priming</i> combinado) em biorreator de tanque agitado após coloração com o corante FDA.....	77
Figura 22. Análise metabólica das UC-MSC expandidas em biorreator de tanque agitado em normóxia (DO 20%) ou hipóxia (DO 5%) e condicionadas com IL-17.....	79

Figura 23. Análise de multipotencialidade de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	82
Figura 24. Efeito do meio condicionado de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17, na migração de HUVEC.	84
Figura 25. Potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	85
Figura 26. Potencial de inibição da proliferação de linfócitos de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	86
Figura 27. Perfil de expressão de proteínas relacionadas a angiogênese no secretoma de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	87
Figura 28. Perfil de proteínas angiogênicos no secretoma de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	90
Figura 29. Perfil de citocinas no secretoma de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	92
Figura 30. Perfil de citocinas no secretoma de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	94
Figura 31. Concentração de PGE-2, IDO, TGF-β e VEGF no secretoma de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	96
Figura 32. Análise do processo autofágico em UC-MSc cultivadas em biorreator em normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil imunofenotípico de UC-MSC pré e pós-cultivo em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.....	80
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS1	metalopectidase com motivo 1 de trombospondina 1
AKT	proteína quinase B
AMPK	proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANG	angiogenina
ANGPT1	angiopoetina tipo 1
ATG	<i>AuTophagy related Genes</i> , genes relacionados com a autofagia
Beclin-	proteína espiralada semelhante a miosina que interage com Bcl2
CCL e CXCL	quimiocinas ligantes de motivos C-C e C-X-C
CCR e CXCR	receptores de quimiocinas
BPM	Boas Práticas de Manufatura
CD	grupamento de diferenciação
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHI3-L1	proteína 1 semelhante a quitinase-3
DAMPs	padrões moleculares associados à dano
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
EBM	meio basal para células endoteliais
EGF	fator de crescimento epidermal
EGM	meio de crescimento para células endoteliais
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK1/2	quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares
Fas e FasL	antígeno indutor de apoptose tipo 1 e seu ligante
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FOXO3	fator de transcrição " <i>forkhead box</i> " tipo 3
FOXP3	fator de transcrição " <i>forkhead box</i> " tipo P3
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GDF-15	fator de crescimento e diferenciação celular 15
GDNF	fator neurotrófico derivado de células gliais
HB-EGF	fator de crescimento semelhante ao EGF ligante de heparina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HLA	human leukocyte antigen
HO-1	heme oxigenase tipo 1
HUVEC	células endoteliais extraídas de cordão umbilical humano
ICAM	molécula de adesão inter-celular
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon gamma
IGF-1	fator de crescimento do tipo 1 semelhante à insulina
IGFBP	proteína de ligação à IGF-1
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
JAK-1	janus quinase 1
LC3B-I e -II	cadeia leve 3 associada a microtúbulos subunidade 1 e 2
LIF	fator inibidor de leucemias
MAPK	quinase ativada por mitógenos
MC	meio condicionado
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos tipo 1

MHC	major histocompatibility complex
M-CSF	fator estimulador de colônias de macrófagos
MIF	fator inibidor da migração de macrófagos
MMP	metaloproteinase de matriz
MSC	células mesenquimais estromais multipotentes
mTOR	proteína alvo da rapamicina
NFκB	factor nuclear kappa B
NK	células assassinas naturais
NO	óxido nítrico
PAMP	padrões moleculares associados à patógenos
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PBS	tampão fostato salino
PD-1/L1	receptor de morte celular programada tipo 1 e seu ligante
PDGF/R	fator de crescimento derivado de plaquetas e seu receptor
PGE2	prostaglandina E-2
PHA	fitohemaglutinina
PI3KC3	subunidade catalítica tipo 3 da fosfatidilinositol quinase 3
PIGF	fator de crescimento placentário
PK1	piruvato quinase 1
PVDF	membrana de fluoreto de polivinilideno
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPMI	meio <i>roswell park memorial institute</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
SFB	soro fetal bovino
SHBG	globulina ligadora de hormônios sexuais
SOD	superóxido dismutase
STAT3	proteína 3 de ativação dos transdutores de sinal para o núcleo
TBS/T	salina tamponada com tris e polissorbato 20
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
Th1, Th2 e Treg	linfócitos auxiliares responsáveis pelos padrões de respostas tipo 1, linfócito T regulador
TIMPS	inibidores de metaloproteinases de matriz
TNF-α	fator de necrose tumoral α
TSG-6	gene 6 estimulado por TNF- α

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Células Estromais Mesenquimais Multipotentes.....	21
1.2. Mecanismos imunomoduladores das MSC.....	23
1.3. Mecanismos angiogênicos das MSC.....	28
1.4. MSC humanas de cordão umbilical.....	29
1.5. Autofagia e MSC.....	30
1.6. Pré-condicionamento ou “priming” de MSC.....	32
1.7. Expansão de MSC em biorreatores.....	37
2. HIPÓTESE, JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Delineamento experimental.....	43
4.2. Isolamento, cultura e caracterização das UC-MS.....	43
4.2.1. Produção de soro AB.....	44
4.2.2. Isolamento e expansão das UC-MS.....	44
4.2.3. Definição das condições para expansão com o microcarregador SphereCol em frasco Spinner.....	45
4.2.4. Expansão em biorreator de tanque agitado com Sphere-Col.....	46
4.2.5. Pré-condicionamento ou “priming” das UC-MS em condição de hipóxia.....	47
4.2.6. Pré-condicionamento ou “priming” das UC-MS com IL-17.....	47
4.2.7. Recuperação celular (Harvest).....	47
4.2.8. Coloração com DAPI e FDA.....	48
4.2.9. Imunofenotipagem das UC-MS.....	48
4.2.10. Ensaio de diferenciação.....	49
4.2.11. Análise metabólica.....	50
4.3. Ensaio funcional in vitro.....	50

4.3.1. Ensaio de potencial parácrino a partir do meio condicionado na migração de células HUVEC	50
4.3.2. Ensaio de avaliação de potencial angiogênico parácrino a partir de meio condicionado	51
4.3.3. Ensaio de imunossupressão da proliferação de células T	51
4.4. Proteome Array	52
4.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	52
4.6. Análise do marcador de autofagia LC3B	53
4.7. Análises estatísticas	54
5. RESULTADOS	55
5.1. PARTE I	55
5.1.1 Padronização da expansão das UC-MSc ancoradas a microcarregadores em biorreator de tanque agitado	55
5.1.2. Cultivo em biorreator de tanque agitado e pré-condicionamento com hipóxia	56
5.1.3. Caracterização do perfil imunofenotípico e do potencial de multidifenciação de UC-MSc expandidas e pré-condicionadas em hipóxia em biorreator de tanque agitado	61
5.1.4 Ensaio funcionais in vitro	64
5.1.4.1 Potencial angiogênico	64
5.1.4.2. Avaliação das propriedades imunossupressoras das UC-MSc	71
5.2. PARTE II	74
5.2.1. Pré-condicionamento de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em normóxia ou hipóxia com IL-17	74
5.2.2. Caracterização das UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17	80
5.2.3. Potencial angiogênico de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17	83
5.2.4. Propriedade imunossupressora de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17	86
5.2.5. Análise do secretoma das UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	87
5.2.6. Análise do processo autofágico de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	97
6. DISCUSSÃO	99
Parte I. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em Hipóxia	101
Parte II. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em hipóxia e/ou IL-17.	107
7. RESUMO DOS RESULTADOS	116
8. CONCLUSÃO	118

9. PUBLICAÇÕES RELACIONADAS A TESE DE DOUTORADO	119
10. REFERÊNCIAS.....	120
10. ANEXOS	136
10.1. Anexo I.....	136
10.2. Anexo II.....	137
10.3. Anexo III.....	138

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células Estromais Mesenquimais Multipotentes

As células estromais mesenquimais (MSC, do inglês “mesenchymal stromal cells”) constituem uma população heterogênea de células progenitoras multipotentes com propriedades imunomoduladoras e regenerativas. Essas células foram originalmente isoladas a partir da medula óssea de roedores como uma população de células aderentes com morfologia fibroblastoide, identificadas como células precursoras osteogênicas e posteriormente como componentes essenciais na manutenção do nicho de células-tronco hematopoéticas (Friedenstein *et al.*, 1970; Owen and Friedenstein, 1988). Atualmente, sabe-se que essas células se encontram no estroma de todos os tecidos adultos, possivelmente com localização perivascular, e contribuem fundamentalmente em processos de homeostase, regeneração e reparo tecidual (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010; Le Blanc and Mougiakakos, 2012; Frenette *et al.*, 2013; Anthony and Link, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Devido a sua capacidade de aderência ao plástico (poliestireno, superfície: TC (*Tissue Culture*) padrão para células aderentes), as MSC podem ser facilmente isoladas e expandidas a partir de uma variedade de tecidos além da medula óssea, como tecido adiposo, polpa dentária e tecidos fetais como cordão umbilical, sangue de cordão umbilical, placenta apesar de sua baixa frequência (Le Blanc and Mougiakakos, 2012). Na medula óssea, sua frequência é estimada em cerca 0,001%-0,01%, por exemplo. As MSC apresentam multipotencialidade, ou seja, capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares especialmente da linhagem mesodérmica, sob condições de cultivo definidas *in vitro* e *in vivo* de maneira mais limitada do que se acreditava inicialmente. Embora tenham características morfológicas e imunofenotípicas, populações de MSC isoladas de diferentes tecidos apresentam diferentes graus de plasticidade e de autorrenovação (Parekkadan and Milwid, 2010; Bernardo and Fibbe, 2013).

Devido à heterogeneidade dessas populações, diante das diferentes fontes, doadores e protocolos de cultivo, e a falta de marcadores específicos, critérios mínimos de definição a fim da caracterização mais uniforme dessas células foram estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Gênica e Celular (Dominici *et*

al., 2006). Além da capacidade de aderência ao plástico e do potencial de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, essas células devem apresentar expressão dos marcadores de superfície CD90, CD73 e CD105, e ausência ou baixa expressão de marcadores das linhagens hematopoética e endotelial, CD34, CD45, CD14 ou CD11b e CD31, e HLA-DR (Le Blanc and Mougiakakos, 2012). As MSC também expressam baixos níveis de MHC de classe I e não expressam MHC de classe II e moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86) em condições de homeostase, e foram anteriormente consideradas hipoinmunogênicas. No entanto, estudos clínicos mais recentes avaliando o perfil imunológico de pacientes submetidos ao transplante com MSC, já descreveram a geração de aloanticorpos, no entanto, sem correlação com a segurança, sendo consideradas relativamente seguras para transplantes alogênicos (Torre *et al.*, 2021). As MSC têm ainda mecanismos de evasão imunológica importantes no contexto de transplante alogênico, como a capacidade em suprimir ativação de células T e a maturação de células apresentadoras de antígenos (APC) (Ankrum *et al.*, 2014; Klimczak and Kozłowska, 2016).

Apesar da diversidade dessas populações, existe um consenso de que essas células compartilham propriedades imunomoduladoras, regenerativas, anti-apoptóticas, anti-fibróticas e angiogênicas (Le Blanc and Davies, 2018). Assim, nos últimos anos, as MSC têm sido extensivamente estudadas acerca do seu potencial terapêutico para uma variedade de doenças imunológicas, inflamatórias e degenerativas, como esclerose múltipla, doença do enxerto contra hospedeiro, doença de Crohn, condições cardiovasculares, como infarto do miocárdio e isquemia.

As propriedades das MSC são mediadas tanto por contato célula-célula, mecanismo importante para o efeito anti-apoptótico e modulação da matriz extracelular, como pelo efeito parácrino através do seu secretoma, que inclui uma variedade de fatores solúveis, como fatores de crescimento e citocinas, além de microvesículas extracelulares envolvidas na transferência de proteínas/peptídeos, mRNA e miRNAs para células-alvo. Dessa forma, as MSC podem ser consideradas o próprio “produto”, no contexto de transplantes alogênicos e autólogos, ou uma “biofábrica” de vesículas/ exossomos e moléculas bioativas (Galipeau *et al.*, 2016; Konala *et al.*, 2016; Marote *et al.*, 2016).

Atualmente, acredita-se que os efeitos terapêuticos das MSC são mediados principalmente pelo seu secretoma, uma vez que em resposta a uma combinação de

moléculas presentes no microambiente inflamado, essas células sofrem um processo de ativação ou “licenciamento” adquirindo um fenótipo anti-inflamatório e produzem grandes quantidades de fatores imunomoduladores, fatores de crescimento e quimioatraentes específicos (Wang *et al.*, 2014), sendo capazes de modular significativamente células imunes inatas e adaptativas (Cagliani *et al.*, 2017).

1.2. Mecanismos imunomoduladores das MSC

Embora ainda não esteja totalmente claro sobre quais fatores desencadeiam e determinam a heterogeneidade dos mecanismos envolvidos, várias moléculas têm sido implicadas nos processos de imunomodulação e regeneração mediados pelas MSC, tais como indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), fator derivado de estroma-1 (SDF-1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento de hepatócito (HGF), prostaglandina E-2 (PGE-2), hemoxigenase-1 (HO), fator inibidor de leucemia (LIF), antígeno leucocitário humano-G (HLA-G), proteína do gene 6 estimulada por TNF (TSG-6), entre outras diversas citocinas/quimiocinas, como IL-8, quimioatraente importante de neutrófilos e CCL2, para monócitos, entre outras (Najar *et al.*, 2016; Cagliani *et al.*, 2017; Chinnadurai *et al.*, 2018).

Assim, as MSC também são capazes de modular o microambiente por induzir células imunes a secretar fatores anti-inflamatórios ou expressarem moléculas de superfície com propriedades imunossupressoras, como PD-L1 e FasL. A secreção de fatores, especialmente TGF- β e PGE-2, pelas MSC induz a diferenciação e expansão de subpopulações de fenótipo imunorregulador, tais como subpopulações de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ e CD8⁺CD28⁻ T, células B reguladoras, células dendríticas e macrófagos M2, produtoras de IL-10 (Bouchlaka *et al.*, 2017), levando a um estado tolerogênico, ou seja, não-reatividade imunológica. As MSC ainda são capazes de influenciar a diferenciação Th1, Th2 e Th17 (Algeri *et al.*, 2015; Najar *et al.*, 2016; Markov *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2021).

Após estímulo inflamatório, especialmente por IFN- γ , MSC humanas expressam altos níveis da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma molécula chave na supressão de células T através da depleção do aminoácido essencial triptofano e geração de metabólitos pela via quinurenina, gerando uma resposta de

estresse via quinase GCN2 que induz parada no ciclo celular e apoptose (Munn *et al.*, 2005; Munn and Mellor, 2013; Chinnadurai *et al.*, 2014). Além disso, a ativação da via GCN2 a partir de IDO em células T CD4+CD25- naive induz expressão de Foxp3 de maneira dependente de TGF- β (Fallarino *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009). Diversos trabalhos identificaram a atividade enzimática de IDO como um dos principais mecanismos imunossupressores em MSC humanas (Shi *et al.*, 2018; Burnham *et al.*, 2020), e tem sido sugerido que a variabilidade das MSC de diferentes doadores quanto à capacidade de supressão de células T está correlacionado ao nível de expressão de IDO. Além disso, IDO expressa por MSC também é capaz de influenciar a diferenciação de monócitos em macrófagos imunossupressores M2 produtores de IL-10 (Francois *et al.*, 2012). A partir de IDO e PGE-2, MSC suprimem a ativação de células NK, inibindo a expressão dos receptores de ativação NKp30, NKp44 e NKG2D na superfície dessas células, assim como inibe suas funções efetoras, como produção de citocinas e atividade citotóxica (Spaggiari *et al.*, 2008).

Rovira e colaboradores (2016) demonstraram que a indução de expressão de IDO em MSC humanas após licenciamento com citocinas *in vitro* está correlacionado com o aumento da acetilação de H3K9 (histona H3 lisina 9) no promotor IDO1, demonstrando o envolvimento com remodelação da cromatina. Curiosamente, essas alterações foram mantidas após criopreservação, e após uma reexposição com citocinas as MSC foram capazes de acumular altos níveis de mRNA de IDO em curto período de tempo (Rovira Gonzalez *et al.*, 2016). Bottcher e colaboradores demonstraram que a depleção de triptofano induzida por IDO perturba a sinalização por mTOR, diminuindo glicólise, promovendo autofagia e induzindo a geração de células T de memória (Bottcher *et al.*, 2016). Por outro lado, MSC murinas induzem supressão principalmente pela expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção de grandes quantidades de óxido nítrico, envolvido na supressão da fosforilação de STAT5 e proliferação de células T. A expressão de iNOS também ocorre em resposta ao estímulo inflamatório pela combinação dos fatores TNF- α , IL-1(α ou kg2d) ou IFN- γ (Ren *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012).

Diversos estudos demonstraram que MSC administradas por infusão intravenosa são aprisionadas na microvasculatura pulmonar e sofrem apoptose rapidamente. No entanto, torna-se cada vez mais evidente que este processo de *clearance* das MSC apoptóticas modula respostas imunes e é importante para seus efeitos terapêuticos (De Witte *et al.*, 2018; Preda *et al.*, 2021). Witte e colaboradores

(2018) demonstraram que UC-MSC administradas por via intravenosa em camundongos foram rapidamente fagocitadas por macrófagos que adquirem fenótipo anti-inflamatório (De Witte *et al.*, 2018).

Em estudo realizado com modelo murino de doença do enxerto *versus* hospedeiro (do inglês, *graft-versus-host disease*, *GvHD*) foi demonstrado que após infusão, as MSC sofrem apoptose por células citotóxicas e são eferocitadas por fagócitos, que são então induzidos a produzirIDO. Pacientes com GvHD que apresentavam alta atividade citotóxica contra MSC responderam mais efetivamente à infusão, demonstrando ser este um mecanismo fundamental para imunossupressão induzida por MSC (Galleu *et al.*, 2017). Monócitos cultivados com MSC apoptóticas efetivamente foram capazes de inibir a proliferação de células T após estímulo CD3/CD28. O efeito imunossupressor foi relacionado com aumento da expressão deIDO, PGE-2 e IL-10. A inibição de COX-2 nos monócitos, mediador chave na síntese de PGE-2, não interferiu na eferocitose das MSC apoptóticas, no entanto, foi suficiente para prevenir a indução deIDO, PD-L1 e IL-10, reduzindo significativamente a atividade imunossupressora desses monócitos sobre células T. Pacientes com GvHD que apresentaram melhor resposta clínica também apresentaram maiores níveis plasmáticos de PGE-2 (Cheung *et al.*, 2019).

Assim comoIDO, a síntese de PGE-2 também é induzida nas MSC após estímulos inflamatórios, tais como com as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α . PGE-2 é um mediador lipídico derivado do ácido araquidônico que tem sua síntese regulada por ciclooxigenases e possui potentes propriedades imunomoduladoras (Burnham *et al.*, 2020). Muitos estudos têm demonstrado que o potencial terapêutico de MSC é dependente de PGE-2 (Németh *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015). Por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, Németh e colaboradores demonstraram que MSC derivadas de medula óssea foram capazes de atenuar a sepse por meio da reprogramação de macrófagos pela secreção de PGE-2, que atua através dos receptores EP2 e EP4 nos macrófagos, induzindo diferenciação dos mesmos em perfil de M2 produtores de IL-10 (Németh *et al.*, 2009). O estudo conduzido por Chen e colaboradores (2010) demonstrou que a inibição da síntese de PGE-2 diminuiu significativamente o efeito imunossupressor de MSC derivadas de cordão umbilical sobre PBMC, enquanto a neutralização de TGF- β eIDO teve poucos efeitos (Chen *et al.*, 2010). Um estudo posterior também demonstrou que UC-MSC transfectadas para superexpressar COX-2 apresentaram efeitos imunomoduladores mais potentes em ensaios *in vitro* que MSC controles ou

superexpressando IDO1, sendo capazes de inibir significativamente a síntese de TNF- α e IFN- γ por linfócitos. O aumento da expressão de COX-2 também induziu maior expressão de genes imunomoduladores nas MSC, tais como IDO, TGF- β , HLA-G5, IL-10, HO e TSG-6 (Li *et al.*, 2015).

A infusão de MSC diminuiu a apoptose e induziu a proliferação de hepatócitos atenuando a insuficiência hepática aguda em modelo experimental a partir da secreção de PGE-2. A regeneração hepática induzida pelas MSC foi relacionada ao aumento da expressão de genes e proteínas YAP1 (Yes-associated protein), importantes no desenvolvimento e regeneração do fígado, que foi diminuída quando a secreção de PGE-2 foi inibida nas MSC (Liu *et al.*, 2019).

Em um estudo recente, Wang e colaboradores (2021) demonstraram que a administração de MSC suprimiu a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos do fígado através da inibição da via de sinalização TAK1 (TGF- β -activated kinase 1)-NF- κ B, melhorando a inflamação em modelo de insuficiência hepática aguda via secreção de PGE-2, uma vez que MSC deficientes em COX-2 não apresentaram o mesmo efeito. Além disso, estes autores demonstraram que as MSC induziram polarização de macrófagos M2 no fígado, evidenciado pelo aumento da expressão de mRNA dos marcadores Arg1, Mgl1, Mgl2 e Yml nos macrófagos, acompanhado do aumento dos níveis séricos de IL-10. A inibição de EPI-4, receptor de PGE-2, reduziu de maneira significativa os efeitos das MSC em atenuar a inflamação e na polarização de macrófagos (Wang *et al.*, 2021). O trabalho de Kota *et al.* também correlacionou o potencial terapêutico de MSC com a secreção de PGE-2 em modelo de traumatismo craniano. A supressão da expressão de COX-2 prejudicou significativamente a capacidade de BM-MSK em inibir a neuroinflamação, enquanto a supressão de IDO não afetou o efeito das MSC (Kota *et al.*, 2017).

Outros mecanismos importantes aparentemente independentes de IDO e PGE-2 têm sido descritos. MSC expressam isoformas solúveis de HLA-G que são moléculas imunossupressoras (Selmani *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2016). A expressão de HLA-G5 ocorre constitutivamente à baixos níveis em MSC e pode ser aumentada por estímulos inflamatórios e após contato com células T ativadas. A expressão de HLA-G5 por MSC inibe a secreção de IFN- γ e atividade citolítica de células NK. A neutralização de HLA-G5 demonstrou que esta molécula contribui para a supressão da proliferação de células T em reação mista de linfócitos e expansão de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (Selmani *et al.*, 2008). A neutralização de HLA-G5 também

inibiu parcialmente a capacidade de UC-MSc em aumentar a frequência de células Treg a partir de PBMC de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico *in vitro* (Chen et al., 2017).

Chinnadurai e colaboradores demonstraram MSC licenciadas com IFN- γ inibem a proliferação e função efetora de células T através da expressão de B7H1/PD-L1 e B7DC/ PD-L2, de maneira independente de IDO (Chinnadurai *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que a secreção de PD-L1 e PD-L2 solúvel por MSC após exposição à IFN- γ e TNF- α suprime a ativação de células T CD4+, inibe a fosforilação de AKT e a secreção de IL-2, induzindo hiporresponsividade e morte celular (Davies *et al.*, 2017). Lavini-Ramos e colaboradores demonstraram que MMP9 tem um papel central na integração de vias envolvidas na imunossupressão, estando correlacionada ao aumento da expressão de CCL22, TNF- α , FasL, RUNX3 e SEMAD4 em MSC de perfil altamente supressor e aumento da expressão de CCR4, IL-4, TBX21, entre outras moléculas, em células T (Lavini-Ramos *et al.*, 2017). Experimentos de cultivo de MSC com linfócitos demonstraram um aumento da expressão de CD39 e consequente da secreção de adenosina, molécula imunossupressora, pelas MSC e também por CD39+CD73+ Tregs em experimentos de co-cultivo, revelando outro importante mecanismo imunorregulador das MSC (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que MSC apresentam importantes propriedades antimicrobianas, mediadas por mecanismos de contato e pela secreção de peptídeos e proteínas antimicrobianos (AMPs) solúveis ou encapsulados por vesículas extracelulares. As MSC aumentam o *clearance* das bactérias em modelos pré-clínicos de sepse, síndrome respiratória aguda e infecções relacionadas a fibrose cística (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017). Os efeitos antivirais dessas células também têm sido investigados nos últimos anos, especialmente relacionados a expressão de ISGs (do inglês, *IFN-stimulated genes*) que têm como alvo diferentes estágios do ciclo viral. Devido às suas propriedades de reduzir inflamação, promover regeneração tecidual, e após infusão facilmente migrarem para os pulmões, houve um rápido aumento do número de ensaios clínicos avaliando a eficácia terapêutica das MSC em pacientes acometidos pela infecção pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 (Rocha *et al.*, 2020).

Além das diversas propriedades imunorreguladoras/imunossupressoras, as MSC possuem a propriedade de migrar para sítios inflamatórios devido à elevada expressão de receptores de quimiocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs) e

moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, sugerindo assim um papel importante na regeneração tecidual, podendo tanto induzir a proliferação e diferenciação de células residentes como fibroblastos, células endoteliais e progenitores teciduais a partir da produção de fatores solúveis, quanto diferenciarem-se em células mesodérmicas funcionais e “substituir” células lesadas, embora de maneira mais limitada *in vivo* (Wang *et al.*, 2014; Markov *et al.*, 2021).

1.3. Mecanismos angiogênicos das MSC

Além das biomoléculas imunossupressoras e imunomoduladoras, o secretoma das MSC contém dezenas de fatores pró-angiogênicos, anti-apoptóticos e anti-fibróticos que auxiliam no reparo de tecidos lesionados (Kehl *et al.*, 2019). Inflamações crônicas, infecções estabelecidas e queimaduras severas, por exemplo, levam à destruição tecidual prolongada. Nesse contexto, o aporte de oxigênio e nutrientes é prejudicado, resultando em isquemia. Dessa forma, angiogênese, a formação de novos vasos, é essencial para otimizar a perfusão sanguínea, e conseqüentemente, maximizar o número de células residentes viáveis, conter o processo fibrótico e restaurar a função do tecido acometido (Di Pietro *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2017; Kehl *et al.*, 2019).

Kehl e colaboradores (2019) mostraram que as MSC humanas possuem potencial angiogênico variável, característica que pode estar relacionada ao seu tecido de origem. Após a avaliação do perfil proteômico do meio condicionado de MSC isoladas do tecido adiposo, de medula óssea e do cordão umbilical, os autores observaram que o meio condicionado das MSC da medula óssea e do cordão umbilical apresentam maiores concentrações de fatores pró-angiogênicos e atraem maior número de macrófagos (Kehl *et al.*, 2019).

Vários estudos em modelos animais demonstram que os macrófagos são cruciais no remodelamento da matriz extracelular, uma vez que auxiliam na degradação da matriz velha e estimulam outros tipos celulares (por exemplo, fibroblastos, endoteliócitos, pericitos e células musculares lisas), que em conjunto, regeneram o tecido lesionado (Corliss *et al.*, 2016). Nesse sentido, as MSC são essenciais para promoverem a expansão de populações celulares que restauram a malha tissular, incluindo os macrófagos (Jin *et al.*, 2019).

MSC humanas expressam vários genes que codificam moléculas relacionadas a mecanismos anti-fibróticos, tais como ADAMTS2, bFGF, COL15A1, COL16A2, COL18A1, COL5A3, DPT, ELN, FBLN2, FBLN5, FMOD, HAPLN1, HGF, HTRA1, LOX, MFAP2/4, MMPs, NID2 e TIMP2, que juntas coordenam a deposição e organização das fibrilas de colágeno, fibronectina e elastina pela atividade dos fibroblastos (Motegi & Ishikawa, 2017; Kehl *et al.*, 2019).

Dentre os genes que codificam fatores pró-angiogênicos e antiapoptóticos também expressos pelas MSCs, estão o ANG, ANGPT1, bFGF, CXCL12, EGF, ESM1, IGF-1, IL-6, JAG1, LIF, MCP-1, MMP-1, PDGF, PIGF, PTN, STC1, TGF- β (Kehl *et al.*, 2019; Maacha *et al.*, 2020).

1.4. MSC humanas de cordão umbilical

Embora as MSC isoladas de medula óssea ainda sejam as mais estudadas e exploradas, as MSC derivadas de tecidos neonatais, como placenta (PL-MS), matriz de cordão umbilical (UC-MS) ou de tecido conjuntivo da mucosa de cordão, denominada geléia de Wharton (do inglês, *Wharton's Jelly*; *WJ-MS*), têm sido cada vez mais exploradas para aplicações clínicas pois podem ser facilmente isoladas e expandidas em grandes quantidades *in vitro*. Alguns estudos têm demonstrado que MSC isoladas de cordão umbilical (do inglês, *umbilical cord derived mesenchymal stromal cell*; *UC-MS*) apresentam uma maior capacidade de proliferação/expansão, menor tempo médio de duplicação, maior estabilidade funcional e genética até altas passagens, maior potencial de diferenciação quando comparado à MSC isoladas de outras fontes, além de serem facilmente disponíveis, pois os procedimentos para coleta não são invasivos, seguros e não oferecem riscos (Hass *et al.*, 2011; El Omar *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2017).

Bárcia e colaboradores avaliaram a imunogenicidade e imunossupressão de MSC isoladas de cordão umbilical e medula óssea. Os resultados demonstraram que UC-MS de diferentes doadores consistentemente inibem mais a proliferação de linfócitos, quando comparado a BM-MS, apresentando menor imunogenicidade. UC-MS apresentaram maiores níveis de expressão de moléculas imunomoduladoras de superfície CD200, CD273, CD274 e das citocinas IL-1 β , IL-8, LIF e TGF- β 2, e maior potencial imunossupressor em modelo experimental de inflamação aguda (Bárcia *et*

al., 2015). WJ-MSC apresentaram maior potencial imunossupressor *in vitro* quando comparadas às BM-MSC, independente de condicionamento com IFN- γ . A análise de marcadores de ativação em linfócitos indicou diferentes padrões de expressão quando co-cultivados com WJ-MSC ou BM-MSC, e diferentes níveis de expressão das moléculas imunomoduladoras IDO, HGF e PGE-2 foram observados entre as MSC das duas fontes independentemente ou em resposta ao estímulo com citocina inflamatória, demonstrando que a inflamação pode afetar distintamente MSC de diferentes fontes (Prasanna *et al.*, 2010).

Amable *et al.* também observaram maior potencial proliferativo e maior secreção de quimiocinas e fatores de crescimento por WJ-MSC, em comparação com AT- e BM-MSC (Amable *et al.*, 2014). Em outro estudo comparativo, WJ-MSC apresentaram maiores efeitos supressores em comparação a AT-, PL- e BM-MSC. Em relação a genes do sistema imune, as WJ-MSC apresentaram menor expressão dos genes do MHC II, TLR4, TLR3, JAG1, NOTCH2 e NOTCH3. As WJ-MSC também apresentaram taxa de crescimento mais rápida e maior potencial de diferenciação osteogênica (Li *et al.*, 2014).

Devido a resultados promissores em estudos pré-clínicos (Banerjee *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017), a segurança e potencial terapêutico das UC-MSC tem sido amplamente investigado para uma extensa gama de doenças em estudos clínicos desde 2009. Estes estudos demonstram segurança da terapia com UC-MSC evidenciada pela ausência de efeitos adversos em longo prazo, de formação de tumor ou de rejeição celular. Os estudos revelaram diferentes níveis de eficácia (Can *et al.*, 2017).

1.5. Autofagia e MSC

A autofagia é o principal processo de reciclagem e degradação lisossomal de proteínas e organelas altamente conservado em células eucarióticas e tem um papel importante na manutenção da homeostase (Khandia *et al.*, 2019). O processo de autofagia pode ocorrer por três vias distintas, diante dos mecanismos de entrega da carga citoplasmática aos lisossomos, denominadas macroautofagia (ou simplesmente, autofagia), microautofagia ou autofagia mediada por chaperona, sendo a primeira a mais estudada em MSC (Khandia *et al.*, 2019). Na autofagia, os

componentes são sequestrados em vesículas de membrana dupla, denominados autofagossomos, que são formados por um processo de múltiplas etapas direcionado a partir dos complexos proteicos ULK, ATG9L, ATG14L (PI (3)K (fosfatidilinositol-3-OH quinase)), ATG16L1, ATG2-WIPI, o sistema de conjugação ATG12 e LC3. Desta forma, os genes relacionados a autofagia (ATG), como Atg7, Atg12, Atg5 e Becn1, regulam a maturação do autofagossomo (Shibutani *et al.*, 2015; Riffelmacher *et al.*, 2018).

A formação de autofagossomos ocorre a níveis basais em condições de não-estresse, mas pode ser induzida por diferentes condições de estresse celular, como a privação de nutrientes, e pode estar desregulada em muitas condições patológicas, como doenças autoimunes, degenerativas e câncer (Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020). Recentemente tem sido proposto que o processo de autofagia pode estar associado com as funções das MSC, seja pela modulação da autofagia nessas células, alterando diretamente suas funções, seja pelo potencial das MSC em modular a autofagia em células imunes, e desta forma, afetando seus efeitos terapêuticos (Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020).

MSC apresentaram níveis aumentados de autofagia a partir da regulação positiva de BECN1 em resposta ao microambiente inflamatório de fibrose hepática *in vivo* (Wang *et al.*, 2020). No entanto, a inibição da autofagia via silenciamento de BECN-1 melhorou o seu efeito anti-fibrótico, que foi relacionado à diminuição da infiltração de células inflamatórias, reduzida proliferação e secreção de pro-colágeno por células estreladas hepáticas, que são progenitoras de miofibroblastos, e inibição da produção de citocinas inflamatórias TNF- α , IFN- γ e TGF- β 1, parcialmente mediada via secreção de PGE-2 (Wang *et al.*, 2020). Esses resultados corroboraram um estudo anterior que demonstrou o mesmo efeito em modelo experimental de encefalomielite autoimune (Dang *et al.*, 2014).

Em contrapartida, no estudo conduzido por Gao e colaboradores (2016), a indução da autofagia por rapamicina em MSC aumentou o potencial de inibição da proliferação de células TCD4⁺, associado principalmente ao aumento da secreção de TGF- β 1 (Gao *et al.*, 2016). O tratamento com rapamicina também aumentou a migração de células TCD4⁺ através da secreção de CXCL8/ IL-8, e a diferenciação de células Treg, via secreção de TGF- β 1, assim como inibiu linfócitos perfil Th1 e a secreção das citocinas IL-17, IFN- γ e IL-2 (Cen *et al.*, 2019). Exossomos derivados de BM-MSK de ratos melhoraram a função renal e renovação tecidual com significativo

aumento da expressão dos marcadores de autofagia Beclin-1 e LC3-II e diminuição da expressão de mTOR em modelo de nefropatia diabética (Ebrahim *et al.*, 2018).

Chinnadurai *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com IFN- γ aumentou a capacidade imunossupressora de MSC, que foi acompanhado do aumento da expressão de genes associados a indução de autofagia, como BECN-1, ATG12, ATG5, ATG16L1, ATG7 e LC3. No entanto, o potencial imunossupressor foi mantido quando a autofagia foi inibida (Chinnadurai *et al.*, 2015). Portanto, os resultados da literatura são bastante conflitantes até o momento, mas existem fortes evidências indicando que o processo de autofagia, ocorrendo nas MSC ou induzido por elas, desencadeia mecanismos que estão direto ou indiretamente associados ao maior potencial terapêutico dessas células.

1.6. Pré-condicionamento ou “*priming*” de MSC

Apesar das MSC demonstrarem grande potencial imunossupressor *in vitro* e em modelos pré-clínicos, os resultados em ensaios clínicos ainda são bastante conflitantes. Essas discrepâncias podem ser atribuídas, em parte, pela incapacidade dessas células de sobreviverem e/ou exercerem suas funções no microambiente lesionado/inflamado após serem transplantadas. Nesse sentido, um grande número de trabalhos tem buscado diversas estratégias para melhorar funcionalmente e/ou aumentar a sobrevivência dessas MSC *in vivo*, seja pela modificação do meio ou condição de cultivo, ou com estimulação pró-inflamatória (pré-condicionamento ou *priming*) (Beegle *et al.*, 2015; De Witte *et al.*, 2015; Klimczak and Kozłowska, 2016; Sangiorgi *et al.*, 2016; Saporov *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2017; Najjar *et al.*, 2018; Noronha *et al.*, 2019) (Figura 1).

Alguns protocolos de expansão têm demonstrado que o condicionamento com hipóxia aumenta a proliferação e secreção de diversos fatores solúveis pelas MSC (De Witte *et al.*, 2015; Zhilai *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a tensão de oxigênio nos tecidos raramente excede 5-7%, fazendo com que a expansão em ambientes com altos teores de oxigênio leve a uma necessária adaptação e, possivelmente, ao estresse celular, e uma posterior readaptação quando elas são transplantadas (Lavrentieva *et al.*, 2010). Alguns estudos já evidenciaram que os elevados níveis ambientais de O₂ podem levar à senescência precoce, extensão do tempo de

duplicação da população e dano ao DNA (Fehrer *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 2012; Haque *et al.*, 2013; Betous *et al.*, 2017).

Nesse contexto, diversos trabalhos já demonstraram que MSC cultivadas em hipóxia, mimetizando assim suas condições de teor de oxigênio tecidual *in vivo*, apresentam maior potencial angiogênico e regenerativo (Leroux *et al.*, 2010). A exposição de MSC à hipóxia induz mecanismos anti-apoptóticos, através da fosforilação de AKT e BAD, e aumento de expressão de BCL-XL e BAG1, além de maior secreção de VEGF (Bader *et al.*, 2015).

UC-MSc cultivadas em hipóxia apresentaram reduzido consumo de oxigênio, maior capacidade proliferativa, reduzida ou ausência de apoptose celular, indução de HIF1 α (fator induzido por hipóxia-1), e elevação da expressão dos genes PDK-1, GLUT-1 e LDH (associados ao metabolismo energético) e redução da respiração mitocondrial (Lavrentieva *et al.*, 2010). Além disso, essas células apresentam consequente aumento do consumo de glicose, uma menor produção de espécies reativas de oxigênio, com isso, menores taxas de encurtamento telomérico e estadiamento da senescência celular (Lavrentieva *et al.*, 2010). Além disso, MSC isoladas de placenta quando submetidas à hipóxia, aumentam a expressão de diversas moléculas de adesão e apresentam maior potencial angiogênico *in vitro* (Mathew *et al.*, 2017). Além disso, essas células ainda apresentam aumento da expressão de GLUT-2 e secreção de insulina, essencial para a mediação do transporte de glicose necessário para processos regenerativos (Mathew *et al.*, 2017). Alguns trabalhos já demonstraram que o aumento de HIF1 α também está associado à maior expressão de receptores de quimiocinas, como CXCR4, CXCR7 e CX3CR1, facilitando assim a migração de MSC transplantadas para o sítio alvo (Haque *et al.*, 2013).

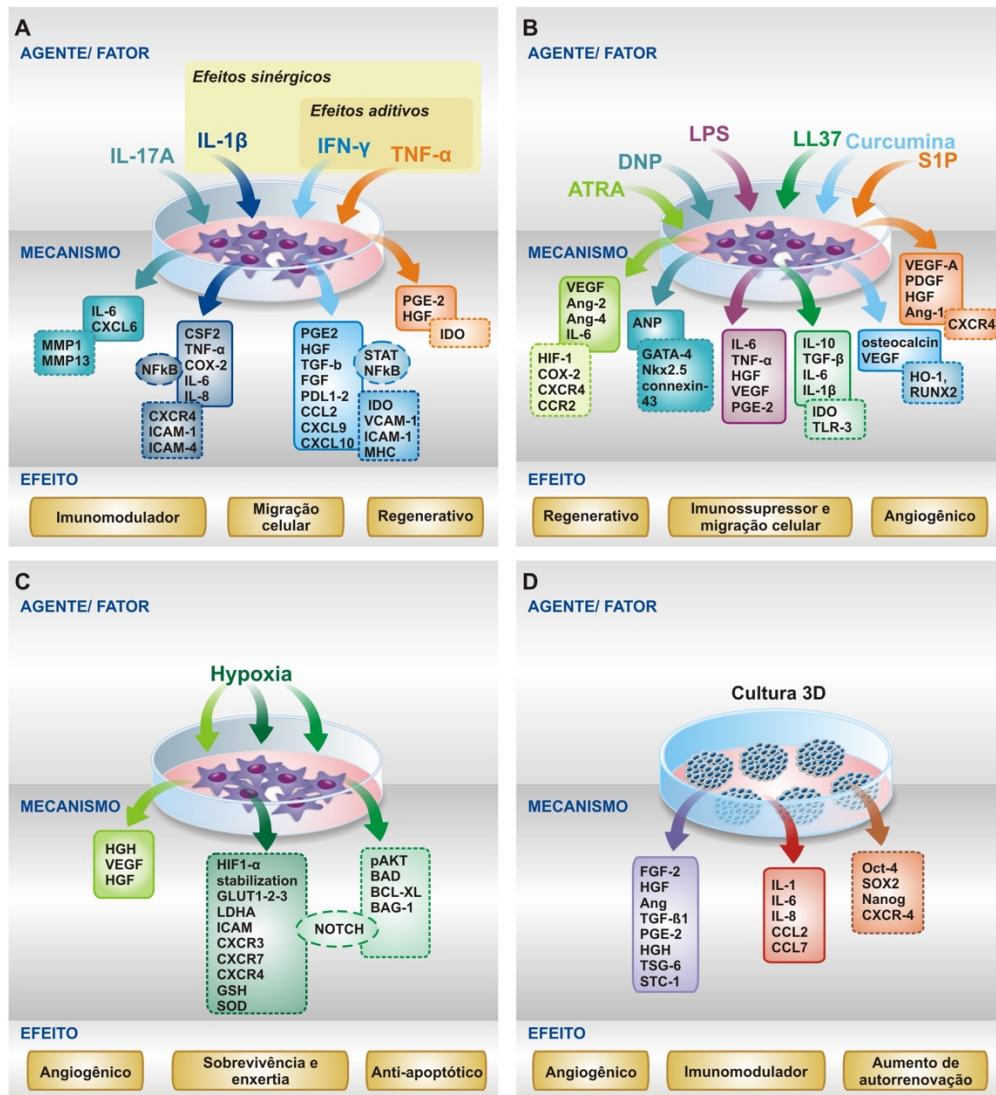


Figura 1. Representação esquemática das abordagens de pré-condicionamento/priming de MSC mais utilizadas. (A) citocinas ou fatores de crescimento, **(B)** agentes químicos/fármacos, **(C)** hipóxia e **(D)** culturas 3D. Alguns dos mecanismos de efeitos conhecidos para cada estratégia de condicionamento estão citados em retângulos com linhas retas (para moléculas secretadas) e com linhas pontilhadas (para genes expressos). Os principais efeitos (angiogênico, sobrevivência, migração, imunossupressor, imunomodulador) desencadeados pelas abordagens de condicionamento estão mostrados nos retângulos em amarelo. Fonte: modificado de Noronha et al. (2019).

Por outro lado, diversos trabalhos demonstraram o efeito do condicionamento de MSC com citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , pelo aumento do potencial imunossupressor, maior secreção de diversos fatores (tais como IDO e PGE-2), e maior inibição de proliferação de células T CD4⁺, T CD8⁺ e NK. Interessantemente, Chinnadurai e colaboradores demonstraram que o licenciamento com IFN γ pode reestabelecer as propriedades imunossupressoras de MSC senescentes, através da ativação de genes reguladores, incluindo IDO (Chinnadurai *et al.*, 2017). No entanto, o licenciamento de MSC com essas citocinas também induz

a alta expressão de moléculas MHC (I e II) e co-estimuladoras (De Witte *et al.*, 2015; Saparov *et al.*, 2016).

Nesse cenário, o pré-condicionamento com interleucina-17 (IL-17) tem demonstrado resultados interessantes. A IL-17 (ou IL-17A) é a mais amplamente estudada dentre os seis membros da família de interleucinas IL-17 atualmente descritos (IL-17A - F), é predominantemente secretada por células Th17, mas também em pequenas quantidades por células T CD8⁺, células B e células estromais, incluindo MSC (Gaffen, 2009; Mojsilovic *et al.*, 2015). Apesar disso, ainda existem poucos dados disponíveis sobre a influência da IL-17 nos processos de proliferação, diferenciação e função das MSC.

A IL-17 é expressa em resposta a citocinas, tais como TGF- β , IL-1, IL-6, IL-21 e IL-23, através da ativação de fatores de transcrição ROR γ t e STAT3 (Gaffen, 2009; Han *et al.*, 2014; Mojsilovic *et al.*, 2015). A sinalização via IL-17 induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas de remodelamento tecidual, além de outros mediadores pelas células-alvo. Desta forma, a via de sinalização da IL-17 é efetivamente importante em processos fisiológicos, particularmente na homeostasia do metabolismo ósseo e hematopoético (Mojsilovic *et al.*, 2015; Ono *et al.*, 2016), bem como na patogênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias.

Alguns trabalhos demonstraram que a IL-17 aumenta a proliferação de BM-MSCs humanas e murinas de uma maneira dose-dependente (Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Mojsilovic *et al.*, 2015). Em BM-MSCs humanas, esse efeito foi dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir da ativação da via MAPK/ERK por meio de ACT-1 (molécula adaptadora) e TRAF-6 [(TNF) receptor-associated factor 6]. O mesmo trabalho demonstrou que a IL-17 induziu maior migração, motilidade e diferenciação osteoblástica nas BM-MSCs. IL-17 também induziu a expressão de M-CSF e RANKL nas BM-MSCs, estimulando assim a osteoclastogênese *in vitro* e *in vivo* (Huang *et al.*, 2009). Em contrapartida, Osta *et al.* (2014) observaram que IL-17 pode induzir a formação de matriz óssea em BM-MSCs somente em combinação com TNF- α , no entanto com significativa diminuição da expressão de RANKL (Osta *et al.*, 2014).

IL-17 pode aumentar a produção de leptina em BM-MSCs, que inibe adipogênese e promove osteogênese via JAK/STAT (Noh, 2012). Além da inibição da diferenciação adipogênica de maneira dose-dependente, observou-se aumento a

expressão de mRNA e secreção de IL-6 e IL-8 durante o processo de diferenciação, assim como aumento da expressão de COX-2 e dos níveis de PGE-2 em adipócitos diferenciados a partir de BM-MSC com o tratamento com IL-17 (Shin *et al.*, 2009). No entanto, a diferenciação osteogênica foi suprimida em MSC murinas por IL-17, via I κ B quinase e NF κ B (Chang *et al.*, 2013). Em outro trabalho, a IL-17 não afetou o potencial de diferenciação de BM-MSC de camundongos (Mojsilovic *et al.*, 2011).

Ono e colaboradores (2016) demonstraram que uma subpopulação de células T inatas, definidas como T $\gamma\delta$ que se encontram distribuídas principalmente nos tecidos periféricos, promovem a formação e regeneração óssea através da expressão de IL-17A, acelerando a formação óssea estimulando a proliferação e diferenciação de células progenitoras mesenquimais IL-17A⁺. Camundongos deficientes em IL-17A apresentaram formação óssea osteoblástica prejudicada (Ono *et al.*, 2016), sugerindo importante papel da IL-17 na regeneração óssea induzida em parte por progenitores mesenquimais teciduais.

Por outro lado, Kondo e colaboradores mostraram que a IL-17 inibe a diferenciação condrogênica em MSC humanas através da supressão de proteína quinase A (PKA) e consequente diminuição da fosforilação de SOX9, fator de transcrição envolvido na condrogênese (Kondo *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que em MSC derivadas de medula óssea e tecido adiposo de camundongos, que a IL-17 pode atuar em sinergismo com TNF- α e IFN- γ , promovendo maior imunossupressão de células T via produção de iNOS. Essas MSC tratadas com essa combinação de citocinas também foram capazes de reduzir a inflamação e a lesão tecidual em modelo murino de hepatite, também de maneira dependente de iNOS (Han *et al.*, 2014).

Em 2015, Sivanathan e colaboradores demonstraram que MSC humanas derivadas de medula óssea condicionadas com IL-17, mantiveram imunofenótipo, morfologia e níveis de expressão de MHC classe I comparáveis às MSC não tratadas, além de não apresentarem aumento da expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras, mantendo assim um fenótipo hipoinmunogênico. Além disso, as MSC condicionadas com IL-17 apresentaram maior potencial imunossupressor de células T ativadas, atribuído ao aumento da expressão de IL-6 e não de IDO, COX-2 e TGF- β . Neste trabalho, as MSC inibiram a expressão de CD25⁺ e secreção de citocinas de perfil Th1 (como TNF- α , IFN- γ e IL-2) em células T, e foram capazes de induzir células iTreg (Sivanathan *et al.*, 2015). Em trabalho subsequente, o mesmo grupo identificou

67 genes diferentemente expressos entre as células MSC tratadas com IL-17 e MSC não tratadas, genes principalmente associados à migração e resposta quimioestática, sendo os genes que codificam MMP1, MMP13 e CXCL6, altamente expressos nas MSC condicionadas a IL-17 (Sivanathan *et al.*, 2017).

Krstić *et al.* mostraram que o pré-condicionamento com IL-17 aumentou a migração e mobilização de MSC derivadas de sangue periférico em ensaio de cicatrização de ferida e gel de colágeno. Concomitantemente, induziu maior expressão de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), envolvida na migração celular pela clivagem de plasmina, protease que decompõe diretamente componentes da matriz extracelular. Além disso, IL-17 aumentou a adesão das MSC a células endoteliais, bem como migração transendotelial, sugerindo que esta citocina pode contribuir para migração de MSC para tecidos lesados e regeneração tecidual (Krstić *et al.*, 2015).

Recentemente, Du-Rocher *et al.* (2020) identificaram a partir da análise de expressão global de mRNA (Chip Array) de MSC co-cultivadas com linfócitos ativados, as vias de sinalização de IFN- γ e IL-17 como as duas principais vias envolvidas no processo de imunossupressão. IL-17 não melhorou diretamente a imunossupressão mediada pelas MSC, mas desencadeou maior migração de MSC (Du-Rocher *et al.*, 2020), corroborando com o trabalho citado anteriormente.

1.7. Expansão de MSC em biorreatores

Devido à baixa frequência das MSC nos tecidos e necessidade de altas doses para infusão nos diversos contextos terapêuticos (1-100 milhões de células/Kg paciente), torna-se essencial a padronização de bioprocessos e tecnologias para expansão em níveis escalonáveis, reprodutíveis e seguros, que possibilitem obtenção de grandes quantidades de células com qualidade terapêutica e ainda com menor custo. Diversas abordagens e tecnologias têm sido testadas e empregadas nesse sentido, sendo que os biorreatores oferecem vantagens consideráveis, como o controle e monitoramento de todo o processo, segurança e escalonabilidade.

Em 2013, foi demonstrado pela primeira vez que o cultivo de BM-MSK humanas em biorreator de tanque agitado, com um volume de trabalho de 2,5L e usando

microcarregador de plástico (poliestireno reticulado) não-poroso que permite o ancoramento das células, resultou em $1,7 \times 10^5$ células/mL em 12 dias de cultivo, uma expansão de cerca de 6 vezes, equivalente a 65 frascos T de 175 cm² (Rafiq *et al.*, 2013).

Além da necessidade de bioprocessos escalonáveis, há um crescente interesse para o estabelecimento de protocolos de expansão livres de xenoantígenos, uma vez que o soro fetal bovino, o suplemento mais amplamente utilizado em protocolos de isolamento e expansão celular, apresenta altas concentrações de proteínas xenogênicas que podem levar a reações imunológicas, além de maior risco de contaminação (vírus, endotoxinas), variação lote a lote e questões éticas (Santos *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2014). Alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos pelo nosso grupo de pesquisa (Centro de Terapia Celular, CTC) com propostas de escalonamento já demonstraram bons resultados (Caruso *et al.*, 2014; Mizukami *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2017; Tozetti *et al.*, 2017).

Mizukami e colaboradores estabeleceram um processo de expansão de UC- MSC em biorreator de tanque agitado usando microcarregadores macroporosos revestidos com gelatina (Cultispher®S) em meio livre de soro (serum-free), e em apenas quatro dias de cultivo obtiveram uma expansão de 7,5 vezes. Além disso, essas células mantiveram potencial imunossupressor e de diferenciação (Mizukami *et al.*, 2016). Mais recentemente, Tozetti e colaboradores, demonstraram ainda que as UC- MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em meio suplementado com soro AB humano, apresentaram menor consumo de glicose e menor formação de lactato quando comparado ao cultivo em frascos spinner, no entanto com baixa recuperação celular, que foi atribuída ao estresse de cisalhamento hidrodinâmico (Tozetti *et al.*, 2017).

Em protocolo semelhante, porém usando meio comercial livre de xenoantígenos, Santos e colaboradores, demonstraram que MSC de duas fontes distintas, medula óssea e tecido adiposo, foram facilmente expandidas em biorreator de tanque agitado, alcançando quantidades clinicamente significativas em apenas 07 dias com um volume de trabalho de 800 mL e sob diferentes condições de saturação de O₂ (4% e 2%). Ambas MSC mantiveram potencial de proliferação e diferenciação, assim como imunofenótipo e metabolismo semelhantes (Dos Santos *et al.*, 2014). Egger e colaboradores demonstraram que MSC humanas derivadas de tecido adiposo expandidas em biorreator de tanque agitado sob condição de hipóxia (5% DO) na

forma de agregados tridimensionais (esferoides), apresentaram aumento da proliferação e da atividade glicolítica, além de manterem imunofenótipo e potencial de multidiferenciação (Egger *et al.*, 2017). Recentemente, usando o mesmo sistema de mini-biorreator de tanque agitado, Moreira *et al.* (2020) alcançaram uma densidade máxima de $2,7 \pm 0,4 \times 10^5$ células/mL após 7 dias de cultivo de AT-MSC usando microcarregadores de plástico (não especificado) (SoloHill) a uma concentração de 20g/L e soro AB humano (Moreira *et al.*, 2020)

2. HIPÓTESE, JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As MSC possuem propriedades imunossupressoras, imunomoduladoras e regenerativas, além de um considerável potencial de expansão *ex vivo*. Estas características tornam essas células um excelente produto celular para terapia de várias desordens imunológicas, inflamatórias e/ou degenerativas. O cordão umbilical é uma das fontes de MSC mais utilizadas atualmente, por apresentar uma população de células mesenquimais com grande potencial de expansão, por sua coleta não ser invasiva e ainda permitir o isolamento de uma população homogênea de MSC logo a partir da segunda passagem de cultivo *in vitro*.

Algumas das limitações do uso de MSC em terapias incluem: a, necessidade de expansão excessiva dessas células para obtenção de um número de células suficientes, que leva à senescência celular, associada à redução do potencial terapêutico das MSC; b, baixa sobrevivência das células pós-transplante pelo encontro de um ambiente inflamatório inóspito, hipóxico e carente de nutrientes, fazendo com que essas células necessitem ainda passar por elevado estresse e processos de adaptação.

Nesse contexto, há uma necessidade imediata do desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas que visem o pré-condicionamento ou “preparo” das MSC *in vitro*, para aumentar a sobrevivência e potencial terapêutico delas *in vivo*, maior direcionamento funcional para condições patológicas específicas e otimização dos bioprocessos de expansão celular em larga escala para atender as normas das agências regulatórias de terapias celulares avançadas.

Diversos protocolos de pré-condicionamento ou *priming* já têm sido testados e descritos na literatura, com resultados promissores, mas ainda pouco efetivos e não direcionados para diferentes doenças. Nesse contexto, alguns trabalhos demonstraram que o pré-condicionamento de MSC com interleucina-17 induz maior proliferação/expansão, maior potencial imunossupressor *in vitro*, além de manter fenótipo minimamente imunogênico. Por outro lado, vários trabalhos já demonstraram que o condicionamento com hipóxia aumenta o potencial angiogênico e regenerativo de MSC, além de retardar a senescência e possibilitar maior estabilidade genética da população celular. Poucos trabalhos da literatura avaliaram o pré-condicionamento de MSC com associação de citocina inflamatória e hipóxia, mas nenhum estudo até o momento avaliou a associação de interleucina-17 e hipóxia. Diante disso, o objetivo

deste trabalho foi também avaliar se os efeitos desses pré-condicionamentos são ou não sinérgicos.

A hipótese estabelecida foi que as MSC derivadas de cordão umbilical quando expandidas e pré-condicionadas com hipóxia e/ou IL-17 em cultivo 3D (pelo cultivo em microcarregadores em biorreator de tanque agitado), apresentam maior potencial imunomodulador e/ou angiogênico *in vitro* do que células sem pré-condicionamento.

O estabelecimento de um bioprocesso escalonável para expansão de MSC pré-condicionadas, em condições livres de xenoantígenos, que apresentem maior potencial terapêutico, é de extrema importância para aplicação dessa terapia a fim de alcançar maior número de pacientes com condições inflamatórias e/ou degenerativas. Atualmente as terapias avançadas como o uso de MSC alogênicas, podem aumentar a sobrevida e a qualidade de vida de pacientes com nenhuma alternativa de tratamento.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral foi caracterizar e avaliar funcionalmente células estromais mesenquimais de cordão umbilical (UC-MSC) expandidas em biorreator de tanque agitado, sob condições livre de xenoantígenos, pré-condicionadas ou não com hipóxia e/ou IL-17.

Para isso, foram estabelecidas as seguintes metas específicas:

1. Avaliar a proliferação e fator de expansão das UC-MSC com o microcarregador *SphereCol* em biorreator de tanque agitado em cultivo livre de xenoantígenos.
2. Estabelecer condições de pré-condicionamento em condições de hipóxia e/ou com interleucina-17 em biorreator de tanque agitado;
3. Caracterizar as UC-MSC pré-condicionadas/ expandidas em condições de hipóxia e/ou com interleucina-17 em biorreator de tanque agitado quanto ao imunofenótipo, metabolismo celular e potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos;
4. Avaliar o potencial imunossupressor *in vitro* das UC-MSC expandidas e pré-condicionadas em condições de hipóxia e/ou com interleucina-17 em biorreator de tanque agitado, por ensaio de inibição da proliferação de linfócitos T;
5. Avaliar o processo autofágico em UC-MSC pré-condicionadas/ expandidas em condições de hipóxia e/ou com interleucina-17 em biorreator de tanque agitado, pela quantificação do marcador de autofagia LC3;
6. Avaliar o potencial angiogênico parácrino *in vitro* por ensaios de migração e angiogênese com células endoteliais de veia de cordão umbilical, usando o meio condicionado das UC-MSC pré-condicionadas/expandidas
7. Quantificar moléculas relacionadas à imunomodulação e angiogênese secretadas por UC-MSC pré-condicionadas/expandidas em condições de hipóxia e/ou com interleucina-17 em biorreator de tanque agitado, pela quantificação de proteínas do meio condicionado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

As células estromais mesenquimais isoladas a partir de amostras de cordão umbilical (UC-MSC) foram ancoradas à microcarregadores, expandidas em biorreator de tanque agitado (cultivo 3D) em condições livres de xenoantígenos e concomitantemente pré-condicionadas ou não com hipóxia e/ou interleucina-17. As UC-MSC pré-condicionadas (e não pré-condicionadas, UC-MSC controles) foram coletadas após cinco dias de cultivo e caracterizadas quanto ao imunofenótipo por citometria de fluxo e quanto a função por ensaios de diferenciação celular, de inibição da proliferação de células T, de potencial parácrino por meio do meio condicionado de indução de angiogênese e migração de células endoteliais e de produção moléculas imunomoduladoras e angiogênicas (Figura 2)

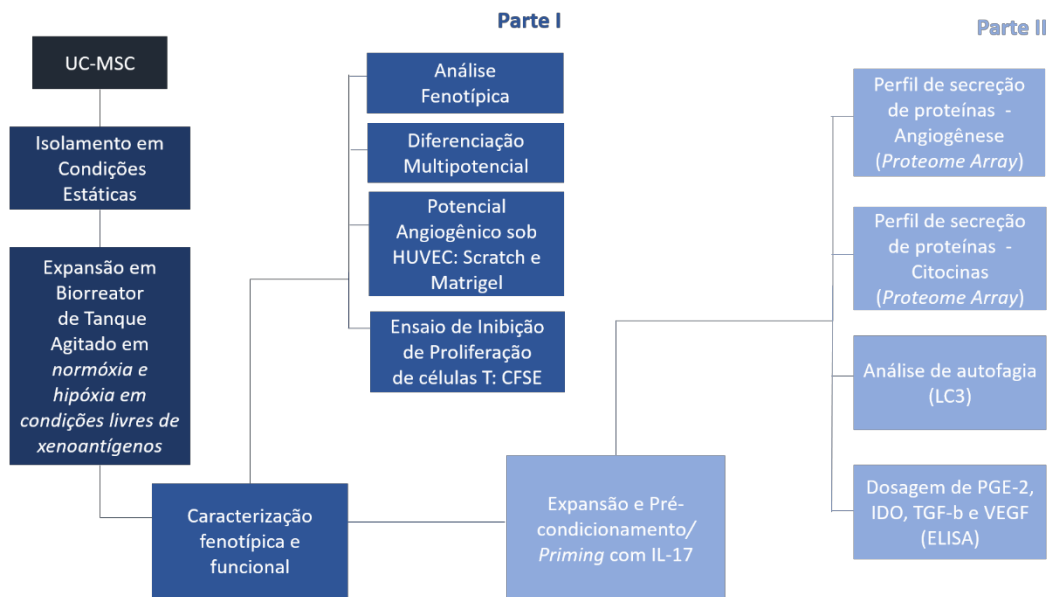


Figura 2. Delineamento experimental.

4.2. Isolamento, cultura e caracterização das UC-MSC

4.2.1. Produção de soro AB

Para o isolamento e cultivo das UC-MSC em condições livres de xenoantígenos foi utilizado soro AB humano obtido a partir de bolsas de plasma de doadores saudáveis cedidas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP; CAAE: 15694613.5.1001.5440). O plasma foi selecionado de acordo com as seguintes características: plasma comum tipo sanguíneo AB positivo, teste de anticorpos irregulares negativos; teste sorológico negativo para hepatite B (HBsAg e anti-HBc), hepatite C, HIV tipo 1 e tipo 2, doença de Chagas, sífilis e vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) tipo 1 e tipo 2; teste de ácido nucleico (NAT) negativo para HIV, hepatite B e C; masculino ou feminino de doadoras sem histórico de gravidez e análise visual (plasma com aparência não lipêmica e sem hemólise).

Para cada lote de soro ou plasma humano convertido em soro (PHCS), seis unidades de plasma AB foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para uma bolsa plástica estéril (Compoflex F730, 1300 mL, Fresenius Kabi, Brasil), sendo 75% do volume de plasma comum isento de crioprecipitado. Foi adicionada solução de CaCl₂ (0,1 mol/l) a uma razão 9:1, e a mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 4-5 horas. Após este período, os coágulos de fibrina formados foram removidos/ rompidos, e o soro obtido foi esterilizado por filtração (0,22 µm) (Stericup Quick Release filter, 0,22 µm, Millipore Express, Germany) e mantido por 48 horas a 4°C. Após este período, havendo ainda formação de fibrina o soro foi refiltrado para remoção. O soro foi inativado a 56°C por 30 minutos e as alíquotas foram armazenadas -20°C até utilização.

4.2.2. Isolamento e expansão das UC-MSC

As amostras de cordão umbilical foram obtidas a partir de recém-nascidos a termo (>37 semanas de gestação), saudáveis, nascidos por parto cesariano no Centro de Referência à Saúde da Mulher – Mater (HC-FMRP-USP), após consentimento informado da doadora/mãe ou responsável legal (CEP/FCFRP-USP Protocolo nº. 486 – CAAE: 98062918.8.0000.5403) (Anexos 1, 2 e 3). As amostras foram armazenadas em biorrepositório intitulado “Biorrepositório de Células Estromais Mesenquimais de Cordão Umbilical” (nº020/2020) (Anexo 4). Os critérios de exclusão utilizados foram: recém-nascidos por via vaginal, gestantes cuja bolsa de líquido amniótico havia se rompido há mais de 18 horas antes do parto, gestantes cuja temperatura corporal

excedesse 38°C durante o parto e gestantes com sorologia positiva para HIV, HBsAg, HCV ou HTLV.

Para o isolamento das UC-MSc, um fragmento de aproximadamente 08 cm de cordão umbilical foi coletado e imediatamente colocado em solução fisiológica 0.9% (Baxter, São Paulo, Brasil) suplementada com albumina humana (1%), glicose (1%) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) e solução antibiótica (1%) (Penicillin-Streptomycin, Gibco, EUA). O material biológico foi mantido a 2-8°C até o processamento (< 24horas).

Após ruptura mecânica, os fragmentos menores foram digeridos em solução colagenase tipo IA 0,5% (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) em meio Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) (Gibco, New York, USA) em volume final de 200 mL. A suspensão foi mantida em agitação constante (50 rpm) a 37° C por 45-60 minutos em frasco *spinner* com impulsor magnético em forma de bulbo (Wheaton Magna- Flex™ Spinner Flask, double sidearm, bulb-shaped glass impeller, 500 mL, DWK Life Sciences Inc.). Posteriormente, foram adicionados à suspensão 200 mL de meio RPMI Medium 1640 (Gibco, EUA) gelado suplementado com 5% de soro AB e solução antibiótica (1%) e mantido em agitação por 10 minutos para inativação enzimática da colagenase. A suspensão celular foi lavada duas vezes em solução tampão fosfato (PBS) (centrifugação a 1500rpm, aceleração 3 e breque 1, por 10 minutos a 4°C), e então ressuspendida em meio α -MEM suplementado com 10% de soro AB e solução antibiótica (1%) (Penicillin-Streptomycin, Gibco, EUA). As células foram plaqueadas em frascos de cultura de poliestireno (frascos T - 175cm²) a uma concentração de 0.5×10^6 células/cm² e cultivadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 5-6 dias, os frascos foram lavados com PBS para remoção das células não aderentes. O meio de cultivo foi trocado (50%) a cada 3-4 dias e as células foram coletadas quando atingiram a confluência de 80% usando TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco, Grand Island, NY), enzima isenta de xenoantígenos. As UC-MSc foram expandidas em frascos T até 2^a-3^a passagem e então criopreservadas ($1-2 \times 10^6$ células/mL em 10% DMSO em Soro AB) em nitrogênio líquido.

4.2.3. Definição das condições para expansão com o microcarregador *SphereCol* em frasco *Spinner*

Para definição das melhores condições de cultivo com o microcarregador *Sphere-Col* foram realizados alguns experimentos em frascos *spinners* de 100

mL (impulsor magnético em forma de pás) com volume de trabalho de 50 mL a fim de selecionar a concentração de células, de microcarregadores e fase de adesão. Foi estabelecido inicialmente a concentração de 5 g/L de microcarregadores. Foram testadas as seguintes condições: inóculo inicial de 2×10^4 células/mL sem fase de adesão, inóculo inicial de 4×10^4 células/mL e fase de adesão com agitação intermitente com duração de 2 horas, e inóculo inicial de 4×10^4 células/mL e fase de adesão com duração de 4 horas.

4.2.4. Expansão em biorreator de tanque agitado com Sphere-Col

Para o cultivo em biorreator, as UC-MSC foram descongeladas e plaqueadas a 3000 células/cm² em frascos T (75cm²) e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Ao atingirem a confluência de 70-80% as células foram coletadas e então inoculadas em um biorreator de tanque agitado de 500 mL (Mini BioBundle Cell Culture, MiniBio 500, Applikon Biotechnology) equipado com impelidor de baixa tensão de cisalhamento de três lâminas (*pitched-blade*, ângulos de 45°, fluxo radial e axial) com volume de trabalho de 200 mL. Para isso, as células foram ancoradas a microcarregadores revestidos com colágeno humano (SphereCol® Human Collagen Coated Beads, Advanced BioMatrix, Inc., California, USA) preparados conforme instruções do fabricante e previamente mantidos em α -MEM 10% AB por 24 horas (*pre-coating*). As UC-MSC foram inoculadas a uma concentração celular inicial de 4×10^4 células/mL em meio α -MEM 10% AB com os microcarregadores (5g/L) (razão células-microcarregadores: 17:1), e cultivadas em condições de pH 7,2-7,4 e temperatura mantida a 37°C. UC-MSC em 4^a-5^a passagem foram usadas para expansão em biorreator (n=3, três doadores diferentes).

Para permitir o ancoramento das células aos microcarregadores foi realizada uma fase de adesão nas primeiras 4 horas de cultivo, que consistiu em agitação intermitente sendo 30 segundos de agitação seguidos de 30 minutos em repouso. Inicialmente a agitação foi mantida em 80 rpm (fase de adesão e primeiro dia de experimento), e aumentada gradativamente até que alcançasse 110-120 rpm ao final do cultivo, evitando a sedimentação dos aglomerados de microcarregadores/células.

4.2.5. Pré-condicionamento ou “priming” das UC-MSc em condição de hipóxia

As UC-MSc (inóculo de 4×10^4 células/mL) ancoradas aos microcarregadores (5g/L) foram expandidas em biorreator por 05 dias em meio α -MEM 10% AB, em condições de pH 7,2-7,4 e temperatura a 37°C. Amostras para quantificação, avaliação da viabilidade celular e análises de metabólitos foram coletadas a cada 24 horas, e a concentração celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante azul de Tripán (0.4%, Sigma-Aldrich, EUA). A concentração de oxigênio dissolvido (DO) foi mantida pela aeração superficial de mistura de gases (CO_2 , O_2 e N_2) e ajustada para 20% para os ensaios em normóxia (controle) e 5% pra os ensaios em hipóxia (condicionamento).

4.2.6. Pré-condicionamento ou “priming” das UC-MSc com IL-17

Para o condicionamento com Interleucina-17, as células foram inoculadas em biorreator nas mesmas condições descritas no item 5.1.3, e foi adicionado ao meio a proteína recombinante IL-17 (Recombinant Human IL-17A (Human Cell-expressed) Protein, R&D Systems, USA) a uma concentração de 50 ng/ml (adaptado a partir de (Sivanathan *et al.*, 2015). Para os experimentos de *priming* combinado IL-17/Hipóxia, o oxigênio dissolvido foi mantido em 5%.

4.2.7. Recuperação celular (Harvest)

Para a recuperação das células pós-expansão em biorreator, a suspensão células/microcarregadores foi transferida para frasco Erlenmeyer estéril (volume 125 mL) e o sobrenadante foi removido. Posteriormente, foi adicionado 60 mL de solução TrypLE™ Select (10x) (Gibco, New York, USA), e a suspensão foi colocada em agitação (120 rpm) a 37°C por 10-15 minutos. Após dissociação das células dos microcarregadores foi adicionado 120 mL de meio α -MEM 10% AB, e a suspensão foi filtrada por *cell strainer* (100 μm , Falcon, Cell Strainer, Becton-Dickson, USA) para permitir a separação das células dos microcarregadores. Para os ensaios *IL-17 priming*, o processo de recuperação celular foi realizado em frascos *spinner* com impulsor magnético em forma de pás (Wheaton Glass, 125mL, Celstir Spinner Flask, Adjustable paddle blade impeller, DWK Life Sciences Inc.) Para isso, o sobrenadante foi removido, e a suspensão células/microcarregadores e Tryple 10X foi transferida

para os frascos e mantida em agitação (50 rpm) por 10-15 minutos a 37°C. Após adição de meio a suspensão foi filtrada por *cell strainer*.

A determinação da densidade celular foi obtida pelo método de exclusão do corante azul de Tripán (0,4%). As células foram imediatamente criopreservadas para ensaios subsequentes.

4.2.8. Coloração com DAPI e FDA

Amostras coletadas diariamente dos cultivos em biorreator foram coradas com DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, Life Technologies, Eugene, EUA) para visualização da distribuição das células aderidas aos microcarregadores. Para isso, 200 µL de suspensão células/microcarregadores foram lavadas com PBS, fixadas por 20 minutos com paraformaldeído (4%), e coradas com DAPI (5 µg/mL) por 10 minutos no escuro. Da mesma forma, 200 µL de suspensão foi corada com o corante FDA (Fluorescein Diacetate, Life Technologies, Eugene, USA) (10 µg/mL) por 5 minutos, para visualização de células viáveis. Após lavagem com PBS, a suspensão células/microcarregadores foi visualizada em microscópio de fluorescência Leica DMI 3000B e as imagens obtidas por meio do software Nikon-ACT1.

4.2.9. Imunofenotipagem das UC-MSc

As UC-MSc pré e pós-cultivo em biorreator foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo para análise de antígenos de superfície. Para isso, alíquotas de 1×10^5 células/ 200 µL em PBS 1x foram distribuídas em tubos FACS e incubadas com 5 µL de anticorpos monoclonais ou isotipos controles apropriados (BD Biosciences, San Jose, CA). Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspendidas em 200 µL de PBS e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). Foram analisados no mínimo 10.000 eventos/amostra com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). CELLQuest™ software (Becton Dickinson, San Jose, CA) foi utilizado pra aquisição e análise. Para a caracterização imunofenotípica foram utilizados os anticorpos monoclonais contra os seguintes marcadores: CD13, CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49e, CD73, CD90, CD105, CD166 e HLA-DR.

4.2.10. Ensaios de diferenciação

O potencial de diferenciação celular *in vitro* das UC-MSC pós-expansão/condicionamento em biorreator foi avaliado pela diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, através do cultivo em meios indutores dos kits: StemPro® Adipogenesis Differentiation, StemPro® Osteogenesis Differentiation e Chondrogenesis StemPro® (Gibco, Grand Island, NY). Para diferenciação osteogênica e adipogênica, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço), mantidas em cultivo até atingirem 70% de confluência e então induzidas com os meios específicos; células cultivadas em meio α -MEM 5% AB foram utilizadas como controle negativo. Para diferenciação condrogênica, as células foram plaqueadas como pequenas gotículas com alta densidade celular (2-5 μ L) em placas de cultura de baixa aderência (Ultra-Low attachment multiwell plates, Corning, Lowell, USA), incubadas por 30 minutos a 37°C, e então o meio indutor de diferenciação foi cuidadosamente adicionado evitando a perturbação das gotículas. O meio de cultivo foi trocado a cada 3-4 dias em todos os ensaios, e após 14 dias de indução as placas foram submetidas à coloração específica.

Para evidenciar a diferenciação adipogênica, as células foram submetidas à coloração com Sudan II-Scarlet que permite a visualização das gotículas lipídicas citoplasmáticas. Para tal, as UC-MSC dos poços diferenciados e poços controles foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com água destilada e incubadas em álcool 70% por 2 minutos e, posteriormente, coradas com Sudan II-Scarlat e Hematoxilina de Harris. A diferenciação osteogênica foi analisada pela coloração Von Kossa, que permite a identificação de precipitados de cálcio. Da mesma maneira, poços diferenciados e poços controles foram submetidos à etapa de fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, as células foram incubadas em solução de nitrato de prata 5% durante 30 minutos protegidas da luz, e em seguida, expostas à luz branca por no mínimo 60 minutos. Após esse período, rapidamente foi adicionada solução de tiosulfato de sódio 5% e as células foram lavadas com água destilada e, por fim, coradas com Hematoxilina de Harris. A diferenciação condrogênica foi evidenciada pela coloração com corante Alcian Blue para identificação da presença de proteoglicanos. As pequenas gotículas foram cuidadosamente lavadas com PBS gelado e fixadas com paraformaldeído 4% por 30

minutos, posteriormente lavadas e coradas com solução Alcian Blue 1% a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, as gotículas foram lavadas com água destilada.

4.2.11. Análise metabólica

As concentrações de glicose e lactato foram determinadas a partir das amostras de sobrenadante coletadas diariamente e realizada em analisador bioquímico YSI 2700 (Yellow Springs Instruments, OH). As taxas específicas de consumo de glicose (q_{Gli}) e de produção de lactato (q_{Lac}) e o rendimento específico aparente de lactato a partir de glicose ($Y_{lac/glu}$) foram determinados conforme previamente descrito por Santos e colaboradores (Dos Santos *et al.*, 2010).

4.3. Ensaio funcionais *in vitro*

4.3.1. Ensaio de potencial parácrino a partir do meio condicionado na migração de células HUVEC

Para esses experimentos foram utilizadas células endoteliais maduras extraídas da veia do cordão umbilical (HUVEC, do inglês *human umbilical vein endothelial cell*) provenientes de cultura primária gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Maristela Delgado Orellana, do Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto da FMRP-USP. As HUVECs foram plaqueadas a uma concentração inicial de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços com meio específico EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium, Lonza, Walkersville, USA). O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias e após atingirem 80% de confluência, com auxílio de uma ponteira (200 μ L), foi feita uma ranhura longitudinal sob a camada de células aderidas. As células foram lavadas com PBS para remoção das células em suspensão, e então foi adicionado meio condicionado (MC) das UC-MSC expandidas em biorreator, acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, GE Healthcare, USA). Foi utilizado meio condicionado misto de experimentos de doadores diferentes de cada condição a fim de minimizar a variabilidade entre doadores. As células foram imediatamente fotografadas (0 hora), e novamente após 20 horas, para cálculo da área de migração. Células mantidas em meio basal (EBM 2% SFB) foram utilizadas como controle negativo, e em meio completo (EGM-2 2% SFB) foram utilizadas como

controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata. A quantificação da área foi determinada por meio do software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

4.3.2. *Ensaio de avaliação de potencial angiogênico parácrino a partir de meio condicionado*

O potencial angiogênico parácrino das UC-MSC pós-expansão/condicionamento em biorreator foi avaliado pelo ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares em meio Matrigel (Growth Factor Reduced – GFR; Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para isso, o matrigel foi previamente plaqueado conforme instruções do fabricante (placa de 96 poços), e incubado por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, HUVEC foram plaqueadas sob o matrigel (2×10^4 células/poço) com meio condicionado das MSC expandidas em biorreator (2% SFB). Igualmente ao ensaio anterior, foi utilizado meio condicionado misto de experimentos de doadores diferentes de cada condição a fim de minimizar a variabilidade entre doadores. A formação das estruturas semelhantes a capilares foi monitorada por microscopia e fotografadas após 15 horas de incubação, quando se verificou a formação de estruturas consistentes. HUVEC plaqueadas com meio basal (EBM 2% SFB) foram utilizadas como controle negativo, e plaqueadas com meio completo (EGM-2 2% SFB) foram utilizadas com controle positivo. A quantificação das estruturas foi realizada através do software ImageJ com uso da ferramenta *Angiogenesis Analyzer* (National Institutes of Health, USA).

4.3.3. *Ensaio de imunossupressão da proliferação de células T*

Para avaliar o potencial imunossupressor *in vitro* das UC-MSC expandidas em biorreator foi utilizado o ensaio de proliferação pela coloração com carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE, do inglês Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester).

Para isso, as UC-MSC expandidas/condicionadas foram co-cultivadas com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) marcadas com (CFSE) (5 μ M) e estimuladas com Phytohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (2 μ g/ml) em diferentes razões UC-MSC/PBMC. PBMC marcadas com CFSE ativadas com PHA cultivadas na ausência de UC-MSC foram utilizadas como controle positivo da proliferação. Após 04 dias de co-cultivo, a proliferação dos linfócitos foi analisada pela diluição de CFSE por citometria de fluxo pela marcação com anticorpos

monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. O índice de proliferação foi calculado considerando as células CFSE-coradas ativadas com PHA com relação às células CFSE-coradas não ativadas. No mínimo 10.000 eventos/amostra foram adquiridos e analisados usando CELLQuest™ software. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4. Proteome Array

Os meios condicionados (MC) dos cultivos em biorreator e sobrenadantes dos ensaios de co-cultivo com PBMC foram utilizados para determinação dos níveis relativos de citocinas selecionadas e proteínas relacionadas à angiogênese, a partir dos kits de Proteome Profiler Array Human XL Cytokine Array e Human Angiogenesis Array (R&D Systems, Minneapolis, USA), conforme instruções do fabricante. Para isso, as amostras de meio condicionado foram coletadas no último dia de cultivo em biorreator e submetidas a centrifugação para remoção de partículas e debris celulares, a 12.000xg a 4° C por 20 minutos, e armazenadas a -20°C até o uso.

Resumidamente, as amostras foram diluídas, adicionadas de um coquetel de anticorpos biotinizados, e posteriormente, incubadas *overnight* com as membranas de nitrocelulose que contém os anticorpos de captura e controle. Posteriormente, as membranas foram lavadas para remoção do material não ligado, seguido de incubação com reagentes estreptavidina-HRP e de detecção quimioluminescente. As membranas foram expostas ao filme de raio-x, e o sinal produzido em cada ponto de captura correspondente a quantidade de proteína ligada, foi quantificado por densitometria usando o software ImageJ (NIH, EUA).

4.5. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Amostras de MC dos cultivos em biorreator e sobrenadantes dos ensaios de co-cultivo com PBMC foram utilizadas para quantificação deIDO, VEGF, TGF- β 1 e PGE-2 pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). As amostras foram previamente centrifugadas a 300xg por 10 minutos a 4°C e posteriormente armazenadas a -20°C. A quantificação foi feita utilizando os kits Human Indoleamina 2,3-dioxigenase/IDO DuoSet, Human VEGF DuoSet, Human TGF-beta1 DuoSet e Prostaglandin E2 Parameter Assay (R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, foi gerada

uma curva padrão para cada ensaio e as amostras, controles e padrão foram analisadas em duplicata. A densidade óptica foi determinada usando um leitor de microplaca ajustado para 450nm.

4.6. Análise do marcador de autofagia LC3B

Amostras de células coletadas a partir dos ensaios em biorreator foram utilizadas para análise do marcador de autofagia LC3B pela técnica Western Blotting. Para obtenção do extrato protéico, as células foram lavadas em PBS1x, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi lisado com tampão CellLytic (Sigma-Aldrich) adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (P8340 e P0044, Sigma Aldrich, respectivamente). As amostras foram submetidas a sonicação no aparelho Sonic Dismembrator (Modelo 100, Thermo Fisher Scientific, EUA) e o lisado celular foi centrifugado a 1.000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) conforme protocolo do fabricante.

Proteínas totais (10 ou 20ug) de cada amostra foram separadas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 15% (SDS-PAGE). Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories, EUA) conforme instruções do fabricante, e padrão de massa molecular para proteínas Page Ruler™ Pre-stained Protein Ladder (26616, Thermo Fisher Scientific, EUA). As condições de eletroforese configuradas foram as seguintes: voltagem constante de 90V durante 90 min. A corrida foi feita em tampão de eletroforese Tris-glicina (Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0.1%, pH=8.3). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana PVDF com poro de 0,22µm (10600021, GE Healthcare, Reino Unido), com tampão de transferência (bicarbonato de sódio 10mM e carbonato de sódio 3,0mM, pH=9.9) por 1h20 a 350mA/gel. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com leite em pó desnatado a 5% (p/v) em solução salina tamponada com Tris (TBS/T) (Tris HCl 25mM, pH=7.5, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%). As membranas foram incubadas a 4°C *overnight* sob agitação suave com anticorpos primários anti-LC3B (Cell Signaling, Massachusetts, USA. Diluição 1:2000) e anti-β-actina (Santa Cruz, Texas, USA. Diluição 1:4000), usada como controle de carregamento, lavadas com TBS/T, e posteriormente com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente, e novamente lavadas. Os imunocomplexos foram detectados

por quimioluminescência utilizando solução de luminol (Tris 0,1M pH=8.5, ácido p-cumárico 400 μ M, luminol 2,5mM) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em sistema de detecção ChemiDoc XRS (BioRad). A quantificação das bandas foi feita por densitometria no software ImageJ (NIH, Maryland, EUA).

4.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPa Software, Inc., CA, EUA). As variáveis foram apresentadas como média \pm desvio padrão (DP) e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os dados foram analisados quanto à distribuição gaussiana (normal) ou não-gaussiana (teste de normalidade) antes da escolha do teste estatístico. As comparações entre as variáveis nos experimentos foram realizadas por diferentes testes estatísticos, conforme explicado a seguir e nas legendas das figuras. Na Parte 1 desse trabalho, o teste T de *Student* para grupos independentes foi o teste estatístico paramétrico utilizado para a comparação de 2 grupos independentes por meio de uma variável dependente quantitativa dos experimentos (experimento de inibição da proliferação de linfócitos).

Na Parte 1 e 2 dos resultados da tese foram utilizados outros testes estatísticos. A análise de variância (ANOVA) unilateral (*one-way*) não-paramétrica (teste estatístico Kruskal-Wallis) foi utilizada para comparar 3 ou mais grupos independentes avaliados por meio de uma variável dependente quantitativa que não possui distribuição normal ou para variáveis qualitativas ordinais (para experimentos de angiogênese, migração, proteoma *array* e ELISA). Quando resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p > 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

A Análise de Variância (ANOVA) bilateral (*two-way*) foi o teste utilizado para a comparação de 3 ou mais grupos divididos por 2 variáveis independentes (fatores de estudo) que avaliaram uma variável dependente quantitativa (numérica) nos experimentos de cinética de expansão celular, fator de expansão celular e de inibição da proliferação de linfócitos. Os testes de comparações múltiplas de Tukey ou de Sidak foram empregados para comparações de 2 grupos.

5. RESULTADOS

5.1. PARTE I

5.1.1 Padronização da expansão das UC-MSC ancoradas a microcarregadores em biorreator de tanque agitado

O microcarregador SphereCol® são *beads* (tamanho ~125-212 μm , 360 cm^2/g) de plástico (não especificado) revestidas com colágeno humano foi selecionado para este trabalho como suporte de ancoramento das UC-MSC para expansão em biorreator de tanque agitado, uma vez que atende às condições de cultivo livres de xenoantígenos. Ensaios iniciais em frascos *spinner* (equipado com impulsor de pá) (Figura 3) foram realizados em diferentes condições para selecionar a melhor condição para expansão das UC-MSC em sistema agitado para os testes posteriores em biorreator. Três condições foram testadas (descritas na legenda) e a condição uma fase de adesão de 4 horas (agitação intermitente: 30 segundos de agitação e 30 minutos estático) foi escolhida pois permitiu intensa expansão celular, com um fator de expansão celular de 11,67 no terceiro dia de cultivo. Além disso, esta condição apresentou excelente taxa de recuperação celular, uma vez que a camada de colágeno é facilmente degradada por digestão pela enzima Tryple™.

Foram realizados também experimentos em biorreator comparando o desempenho do SphereCol com outros dois microcarregadores. Os microcarregadores Cultispher são grânulos de matriz macroporosa de colágeno porcino e foi utilizado para o teste por apresentar uma boa adesão e expansão de células MSC (Mizukami *et al.*, 2016). No entanto, este microcarregador não apresenta boa recuperação celular no processo de tripsinização (*harvesting*), devido à sua porosidade. Além disso, não se enquadra nas condições livres de xenoantígenos, definidas como prioridades no desenvolvimento deste projeto. Em contrapartida, o microcarregador HyQSphere, de matriz de poliestireno, não apresentou boa adesão das UC-MSC em curto tempo de cultivo, como pretendido para viabilizar os ensaios de pré-condicionamento (Figura 3).

Dessa forma, pelo perfil de crescimento com os diferentes microcarregadores em biorreator de tanque agitado, o microcarregador SphereCol possibilitou expansão

satisfatória das UC-MSC em meio suplementado com soro AB com uma fase de adesão de 4 horas em regime intermitente de agitação (Figura 3).

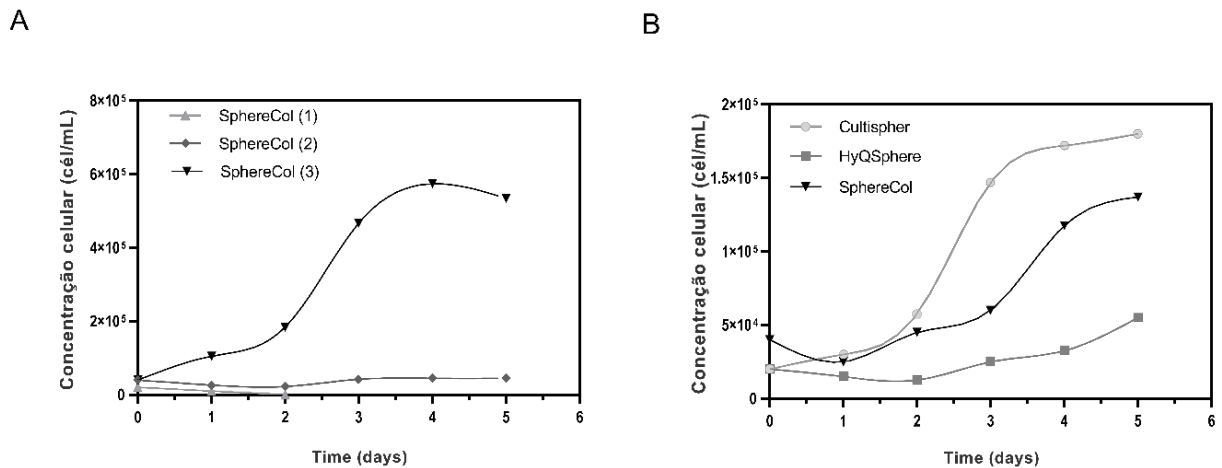


Figura 3. Perfil de crescimento das UC-MSC com o microcarregador SphereCol em condições livre de xenoantígenos. (A) Experimentos testes em frascos *Spinner* com o microcarregador SphereCol (5g/L) e volume de trabalho de 50 mL com inóculo inicial de 2×10^4 células/mL sem fase de adesão [SphereCol (1)], inóculo inicial de 4×10^4 células/mL e fase de adesão com duração de 2 horas [SphereCol (2)], e inóculo inicial de 4×10^4 células/mL e fase de adesão com duração de 4 horas [SphereCol (3)]. As UC-MSC foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% AB em incubadora umidificada, 37°C e 5% CO₂. (B) Perfil de crescimento das UC-MSC com diferentes microcarregadores em biorreator de tanque agitado com volume de trabalho de 200mL. Microcarregador Cultispher (2g/L) com inóculo inicial de 2×10^4 células/mL; HyQSphere (5g/L) com inóculo inicial de 2×10^4 células/mL e microcarregador SphereCol (5g/L) com inóculo inicial de 4×10^4 células/mL e fase de adesão com duração de 4 horas.

5.1.2. Cultivo em biorreator de tanque agitado e pré-condicionamento com hipóxia

A partir do protocolo definido constituído por uma fase de adesão de 4 horas e uma agitação mínima suficiente para manter as células e microcarregadores em suspensão, a fim de facilitar a aderência das células aos microcarregadores, observamos que UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condições de hipóxia (5% O₂) e normóxia (20% O₂) apresentaram adesão similar aos microcarregadores revestidos com colágeno humano (SphereCol), apresentando uma eficiência de adesão de 58 (± 5.5)% e 63 ($\pm 14,25$)%, respectivamente.

A Figura 4 apresenta o perfil de expansão das UC-MSC cultivadas por 5 dias em biorreator em ambas as condições. Ao final do cultivo, obteve-se uma concentração celular de $1,69 (\pm 0,29) \times 10^5$ células/mL dos cultivos sob hipóxia e $1,74 (\pm 0,23) \times 10^5$ células/mL dos ensaios em normóxia, o que corresponde a um fator de expansão de $6,98 (\pm 1,08)$ e $7,46 (\pm 2,0)$ vezes, respectivamente, considerando o

número de células que aderiram com sucesso aos microcarregadores após 24 horas (Figura 4).

Observou-se um discreto aumento do crescimento celular quando as UC-MSc foram cultivadas em condições de normóxia em comparação aos cultivos sob hipóxia em momentos específicos (dias 3 e 4). No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada. Como não foi observada diferença em termos de expansão celular entre as diferentes condições de saturação de oxigênio, podemos concluir que as UC-MSc apresentam boa capacidade de adaptação a diferentes níveis de oxigenação, sem o comprometimento da sua capacidade proliferativa.

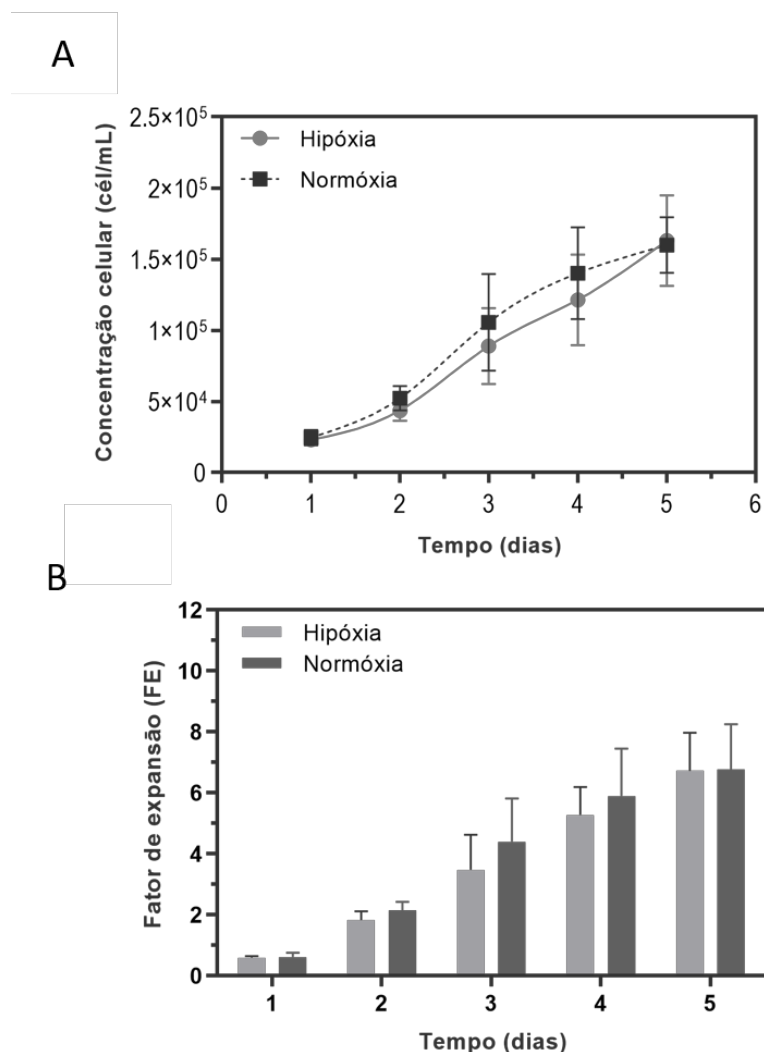


Figura 4. Expansão de UC-MSc em biorreator de tanque agitado pré-condicionadas ou não à hipóxia em condições livres de xenoantígenos. As células foram inoculadas a densidade inicial de 4×10^4 células/mL ancoradas aos microcarregadores (5 g/L) (volume de trabalho de 200 mL). As células foram submetidas a uma fase de adesão com agitação intermitente nas primeiras 4 horas após o inóculo. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida a 5% (hipóxia) ou 20% (normóxia). (A) Perfil de crescimento das UC-MSc nas duas condições, hipóxia e normóxia. (B) Fator de expansão durante 05 dias de cultivo. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$, três diferentes doadores). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste T de Student foi o teste estatístico paramétrico utilizado para a comparação de 2 grupos independentes.

Imagens após coloração com DAPI (Figura 5) e FDA (Figura 6) evidenciaram o ancoramento e colonização gradual dos microcarregadores revestidos com colágeno humano pelas UC-MSc durante o cultivo em biorreator ao longo do tempo, assim como a formação de agregados células/microcarregadores. Após a coloração com DAPI, as células têm os núcleos corados em azul, e podem ser visualizados com microscópio de fluorescência. O FDA (diacetato de fluoresceína) é um substrato permeável à membrana celular que é hidrolisado por esterases intracelulares, servindo como uma sonda de viabilidade (cor verde), tanto pela atividade enzimática necessária para tornar-se fluorescente, quanto pela capacidade de retenção intracelular.

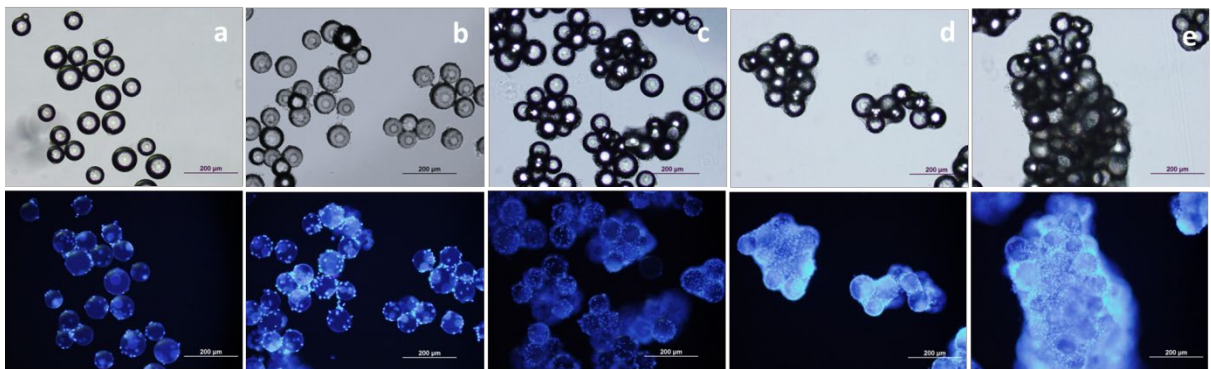


Figura 5. Imagens de UC-MSc cultivadas sob hipóxia com o microcarregador SphereCol em biorreator de tanque agitado após a coloração com DAPI. Amostras foram coletadas diariamente e coradas com DAPI, permitindo a visualização do núcleo celular em azul. As imagens evidenciam a gradual colonização dos microcarregadores pelas UC-MSc ao longo do tempo, no dia 1 (a), dia 2 (b), dia 3 (c), dia 4 (d) e dia 5 (e) do cultivo. (Objetiva 10X).

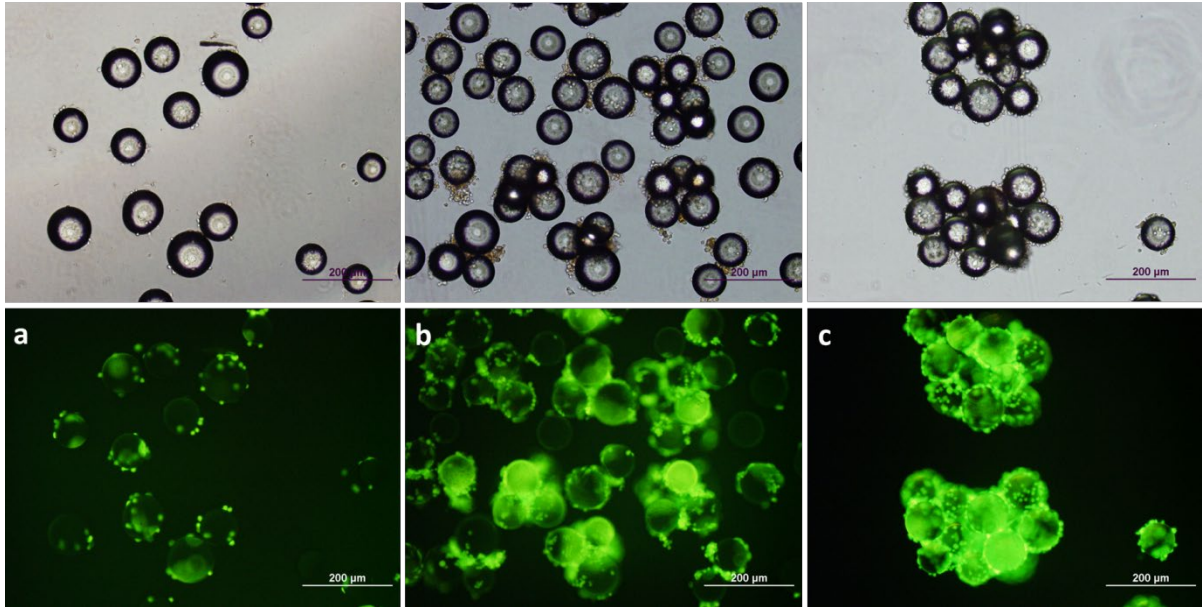


Figura 6. Imagens representativas das UC-MSC cultivadas em biorreator após coloração com o corante FDA. As amostras foram coletadas e coradas para visualização das células viáveis aderidas aos microcarregadores, no dia 1 (a), dia 2 (b) e dia 3 (c). (Objetiva 10X).

O cultivo por mais de 5 dias nas condições otimizadas mostrou formação de agregados maiores, reduzindo a viabilidade celular e a eficiência da recuperação celular (dados não mostrados). A eficiência de recuperação celular pós-cultivo não foi influenciada pelo processo de pré-condicionamento ($75,58 \pm 3,81\%$ para ensaios com hipóxia e $65,80 \pm 9,61\%$ para ensaios em normóxia), apresentando resultados semelhantes a outros estudos que utilizaram expansão em pequena escala com microcarregadores (Figura 7).

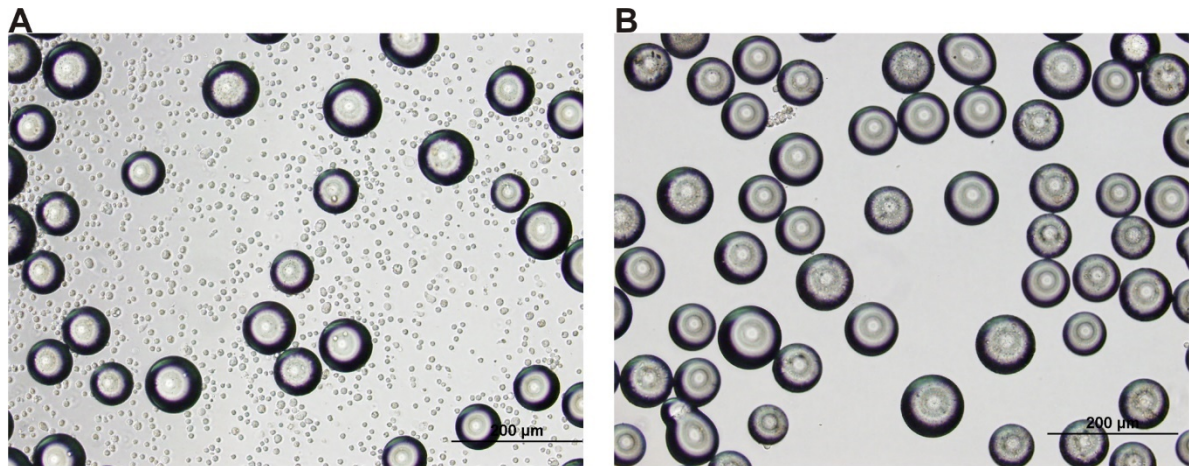


Figura 7. Recuperação celular das UC-MSC pós-cultivo em microcarregadoes em biorreator de tanque agitado. Imagens ilustrativas demonstrando a dissociação das UC-MSC dos microcarregadores SphereCol após digestão enzimática com *Tryple* (A) e após a recuperação celular por filtração por *cell strainer* (B).

Análises de metabolismo foram realizadas para as UC-MSC cultivadas sob as condições de normóxia e hipóxia a partir de amostras de sobrenadante coletadas diariamente. A Figura 8 mostra a concentração de glicose (Figura 8A) e lactato (Figura 8B) durante os cinco dias de expansão para ambas as condições. Uma tendência semelhante foi observada nos ensaios de hipóxia e normóxia, com um consumo gradual de glicose, bem como um aumento gradual na produção de lactato. Em seguida, foram calculadas as taxas de consumo específicas de glicose (Figura 8C) e as taxas específicas de produção de lactato (Figura 8D). As UC-MSC condicionadas à hipóxia apresentaram valores mais altos da taxa específica de consumo de glicose nos primeiros dois dias de cultivo, estatisticamente significativa no segundo dia ($41,7 \pm 10,6$ pmol/célula/dia) em comparação com os cultivos em normóxia ($17,7 \pm 11,2$ pmol /célula/dia). No entanto, os valores tornaram-se semelhantes nos dias seguintes, bem como para as taxas de produção de lactato. É importante ressaltar que a concentração de lactato nunca atingiu valores inibitórios do crescimento celular, acima de 35 mM (Schop et al., 2009), mesmo em protocolo sem troca/adição de meio de cultivo.

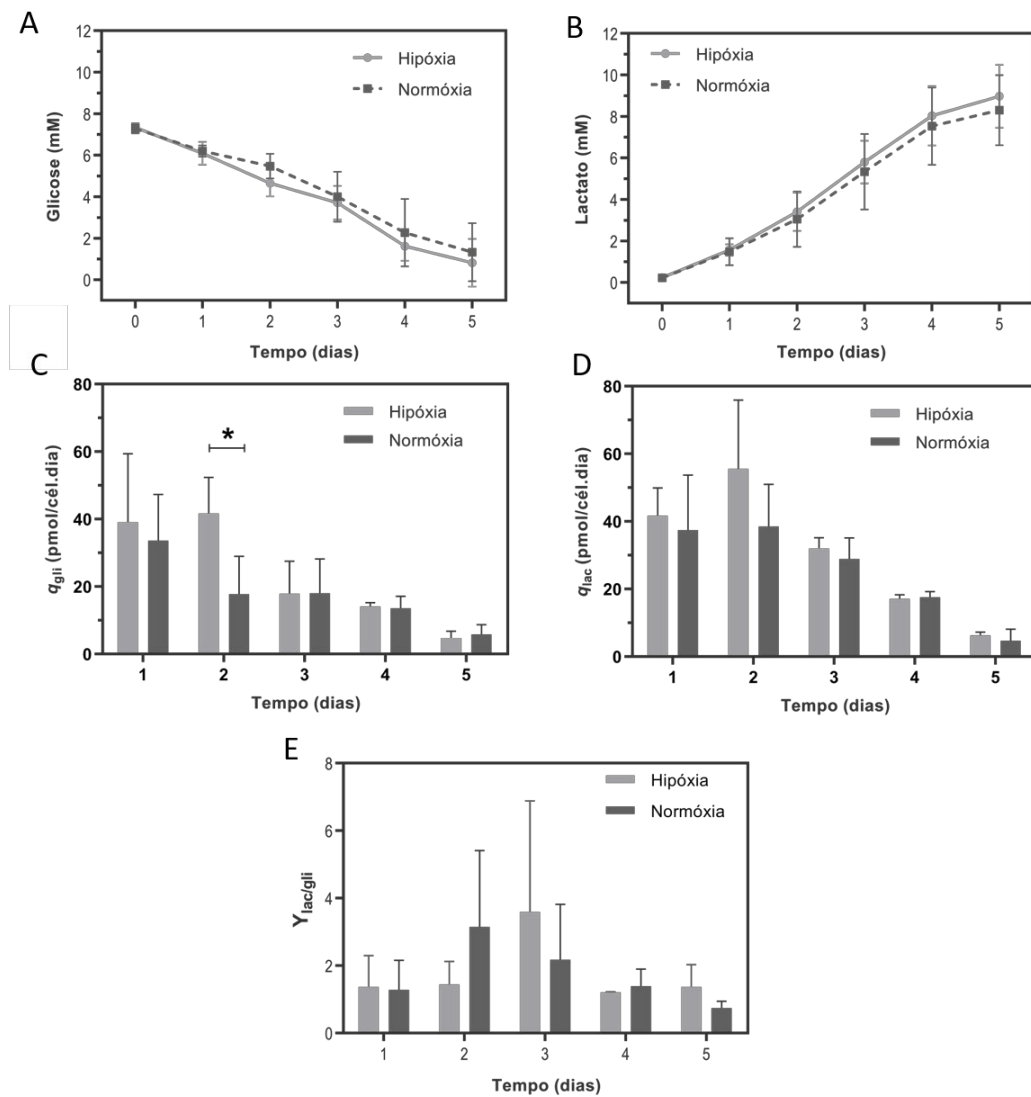


Figura 8. Análise metabólica das UC-MSC expandidas em biorreator em condições livre de xenoantígeno em normóxia (DO 20%) e hipóxia (DO 5%) em 5 dias de cultivo. Perfil de concentração de (A) glicose e (B) lactato. (C) Taxa específica de consumo de glicose e (D) taxa de produção de lactato. (E) Rendimento aparente de lactato a partir de glicose ($Y_{lac/gli}$). Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3, três doadores diferentes). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste T de Student foi o teste estatístico paramétrico utilizado para a comparação de 2 grupos independentes.

Os resultados obtidos sugerem que UC-MSC possuem elevada plasticidade metabólica, podendo assim adaptar rapidamente o consumo de energia e o metabolismo de acordo com os níveis de oxigênio no ambiente.

5.1.3. Caracterização do perfil imunofenotípico e do potencial de multidifeciação de UC-MSC expandidas e pré-condicionadas em hipóxia em biorreator de tanque agitado

As UC-MSc expandidas/pré-condicionadas em biorreator foram analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de antígenos de superfície (Figura 9). As UC-MSc apresentaram perfil imunofenotípico semelhante pré e pós-expansão em ambas as condições (hipóxia e normóxia), com baixa ou ausência da expressão dos marcadores CD14 (monócitos), CD31 (células endoteliais), CD34 (células precursoras hematopoiéticas), CD45 (leucócitos) e especialmente de HLA-DR (molécula MHC de classe II, envolvida na apresentação de antígeno, demonstrando que essas células mantêm baixa imunogenicidade, característica particularmente relevante para a uso alógeno destas células em estudos pré-clínico e clínicos).

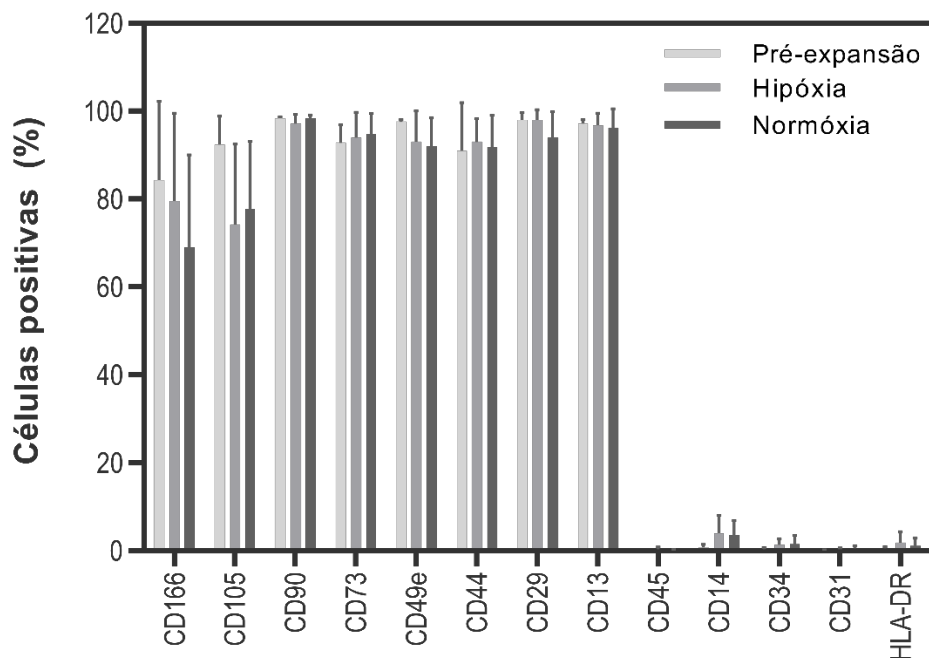


Figura 9. Perfil imunofenotípico das UC-MSc pré e pós-expansão e pré-condicionamento em biorreator de tanque agitado. As UC-MSc foram incubadas com os anticorpos monoclonais para a análise de marcadores de superfície e analisadas por citometria de fluxo. UC-MSc pré-expansão (barras claras), condicionadas em biorreator sob hipóxia – DO 5% (barras em cinza) e expandidas em biorreator em normóxia – DO 20% (barras em preto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p > 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos. (n = 3, três doadores diferentes).

A fim de analisar se UC-MSc mantêm sua multipotencialidade pós-expansão em biorreator de tanque agitado nas diferentes condições, as células foram induzidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica por meio de kits comerciais (Figura 10). Após 14 dias de indução e coloração específica, pode-se confirmar que

UC-MSC expandidas em biorreator em condições de hipóxia e normóxia mantêm potencial de multidiferenciação. A diferenciação adipogênica foi evidenciada pela formação de gotículas lipídicas no citoplasma das células (coloração Sudan-II Scarlet), a diferenciação osteogênica foi confirmada pelo acúmulo de matriz mineralizada (coloração de von Kossa) e a diferenciação condrogênica evidenciada pela formação de proteoglicanos (coloração Alcian Blue). Como citado anteriormente, os estudos têm demonstrado resultados conflitantes quanto a influência do condicionamento com hipóxia sob o potencial de diferenciação de MSC, especialmente em decorrência de diferentes fontes de MSC utilizadas, diferentes concentrações de oxigênio e tempo de condicionamento. Os resultados obtidos aqui, demonstram que o pré-condicionamento com hipóxia (5% O₂) em sistema de cultivo 3D não influenciou o potencial de diferenciação das UC-MSC, sendo semelhante ao das células cultivadas em normóxia.

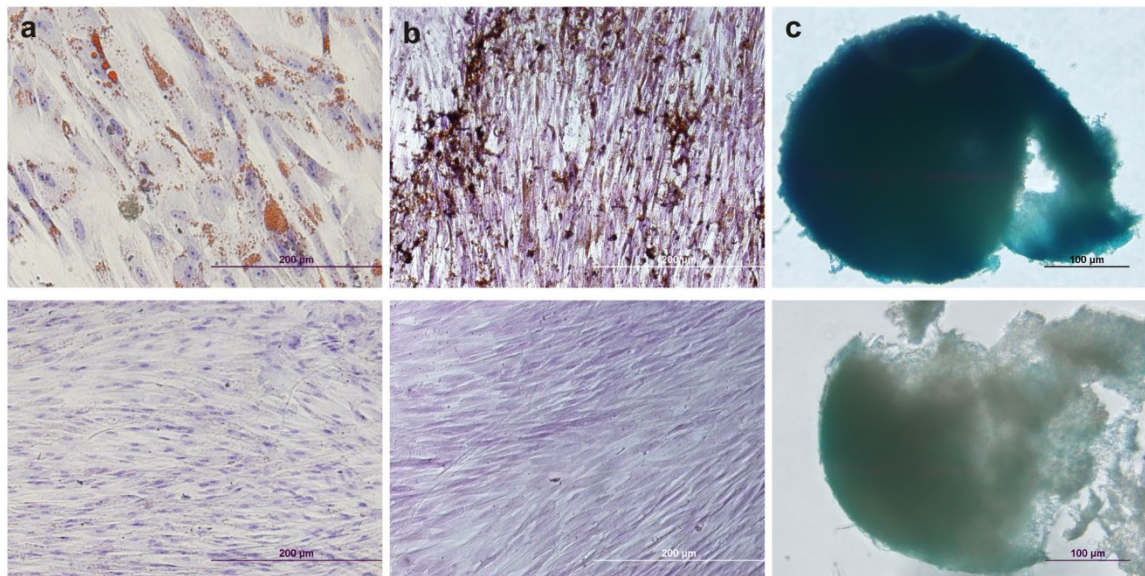


Figura 10. Análise de multipotencialidade de UC-MSC previamente expandidas em biorreator em condição de hipóxia. Após condicionamento à hipóxia em biorreator de tanque agitado, as UC-MSC foram induzidas à diferenciação multipotencial com meios específicos indutores: (A) diferenciação adipogênica, evidenciada pela formação de gotículas lipídicas após 14 dias de indução (Sudan-II Scarlate staining), (B) diferenciação osteogênica evidenciada pela formação de matriz mineralizada (von Kossa staining) e (C) diferenciação condrogênica evidenciada pela formação de proteoglicanos (alcian blue staining). Abaixo, os respectivos controles dos ensaios de diferenciação, UC-MSC cultivadas na ausência de meios indutores e coradas.

5.1.4 Ensaios funcionais *in vitro*

5.1.4.1 Potencial angiogênico

Foram realizados dois ensaios que avaliam o potencial parácrino das UC-MSC expandidas/pré-condicionadas em biorreator sobre células endoteliais isoladas da veia de cordão umbilical (HUVEC). No primeiro ensaio, foi avaliado o potencial do meio condicionado (MC) das UC-MSC pré-condicionadas em induzir a migração de HUVEC em ensaio *scratch*.

A Figura 11 representa um experimento de ensaio de migração de HUVEC tratadas com MC de UC-MSC expandidas em biorreator em hipóxia. O ensaio foi monitorado por um sistema de imagem (*CytoSMART Live Cell Imaging System*, Lonza) por 20 horas, e fotografadas a cada 30 minutos. Como demonstrado o MC induz rápida migração de HUVEC após *scratch* ao longo do tempo. A Figura 12 demonstra imagens representativas de ensaio de migração em 0 hora e 20 horas, com MC das MSC condicionadas à hipóxia (Hipóxia-MC) ou não condicionadas (Normóxia-MC), usadas para a determinação das áreas e cálculo da migração.

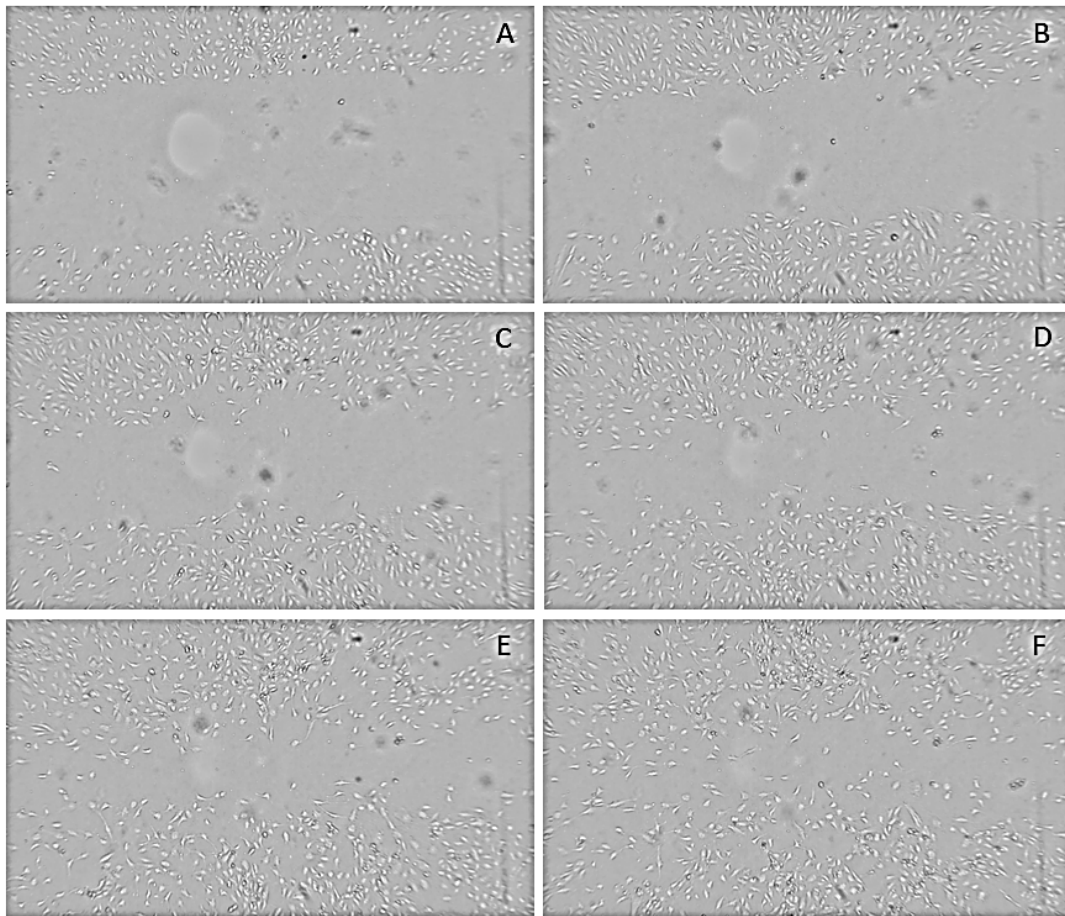


Figura 11. Ensaio de migração de HUVEC tratadas com meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia. As células endoteliais foram plaqueadas a uma concentração 2×10^4 células/poço (placas 24 poços), e após atingirem a confluência de 80%, foi feita uma ranhura longitudinalmente com uma ponteira. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, para remoção das células/debris em suspensão, e o meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia (DO 5%) suplementado com 2% SFB foi adicionado. O ensaio foi monitorado por um sistema de imagem (*CytoSMART Live Cell Imaging System*, Lonza) por 20 horas e fotografadas a cada 30 minutos. (A) 0 hora, (B) 4 horas, (C) 8 horas, (D) 12 horas, (E) 16 horas e (F) 20 horas.

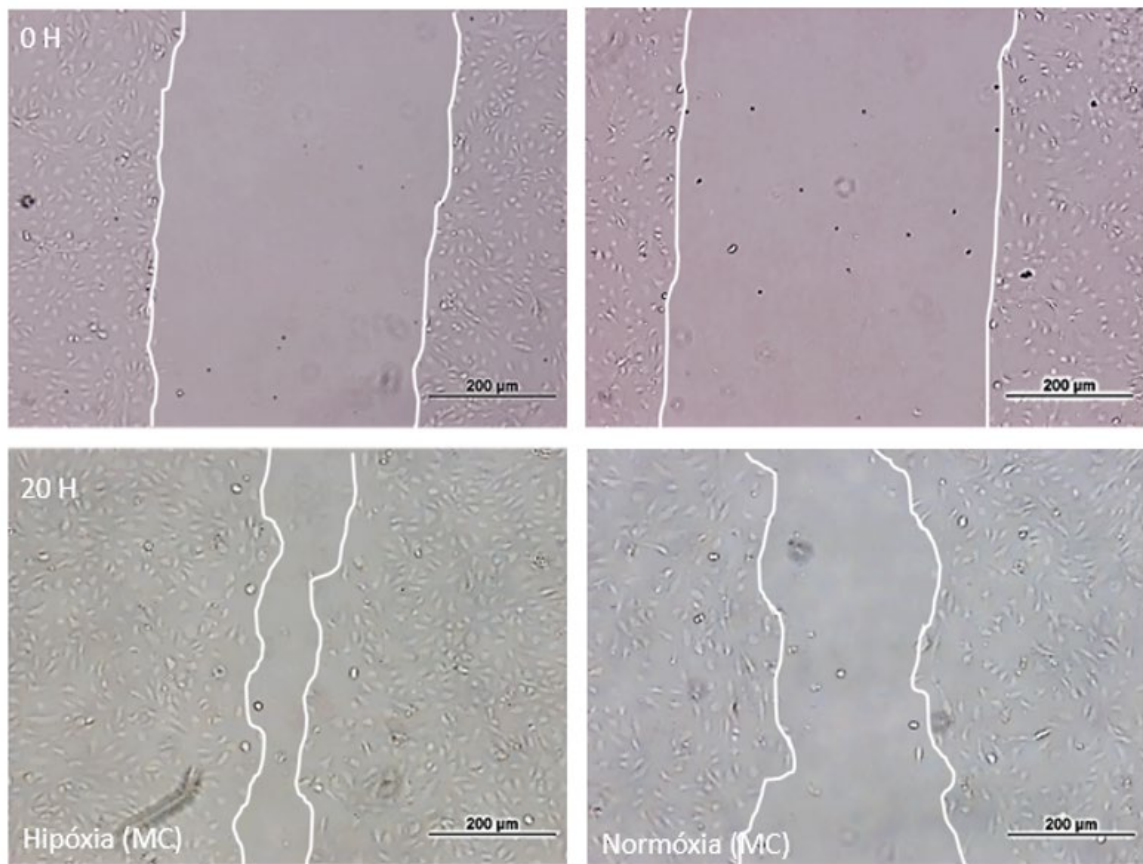


Figura 12. Imagens representativas do ensaio de potencial indutor da migração de HUVEC. Após *scratch*, as HUVEC foram mantidas com CM das UC-MSC expandidas em biorreator condicionadas em hipóxia (Hipóxia-MC) ou não (Normóxia-MC) por 20 horas. As áreas em branco em 0H e 20H foram utilizadas para determinação da taxa de migração por ImageJ Software.

A taxa de migração das HUVEC foi calculada por meio do programa ImageJ, delimitando a área do *scratch* em 0 hora e após 20 horas, utilizando a fórmula: $[(\text{área em branco em 0 h} - \text{área em branco em 24 h}) / \text{área em branco em 0 h}]$ (Figura 12), pelo menos 4 campos microscópicos foram analisados de cada poço, e foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata experimental para cada condição. O MC de UC-MSC condicionadas à hipóxia induziu maior migração de células HUVEC, quando comparado ao MC de UC-MSC expandidas em normóxia ($p < 0.01$), correspondendo a uma taxa de migração de 64.9% (± 0.04) e 45.7% (± 0.08), respectivamente (Figura 13).

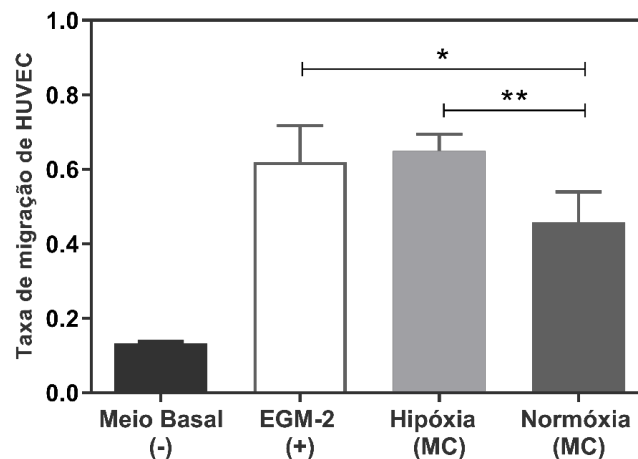


Figura 13. Efeito do meio condicionado de UC-MSC expandidas/pré-condicionadas em biorreator na migração de HUVEC. Após *scratch*, as HUVEC foram mantidas com MC das UC-MSC expandidas em biorreator condicionadas à hipóxia (Hipóxia-MC) ou não (Normóxia-MC) por 20 horas. As áreas em branco em 0h e 20h foram utilizadas para determinação da taxa de migração em ImageJ Software, definida pelo cálculo: $[(\text{área em branco em } 0 \text{ h} - \text{área em branco em } 24 \text{ h}) / \text{área em branco em } 0 \text{ h}]$. n=2 experimentos independentes, em triplicata. Os resultados são apresentados como média +/- desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo (p>0,05), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

Em seguida, o ensaio de formação de tubos ou estruturas semelhantes a capilares, que avalia o potencial angiogênico do secretoma das UC-MSC, foi realizado. Para isso, HUVEC foram plaqueadas sob em meio Matrigel (Matrigel Growth Factor Reduced), previamente incubado a 37°C com MC das UC-MSC expandidas em biorreator. Para minimizar a variabilidade entre amostras de diferentes doadores, também foi utilizado CM misto de experimentos independentes para cada condição.

A Figura 14 representa um experimento onde células HUVEC plaqueadas em Matrigel com ou sem MC de UC-MSC pré-condicionadas em hipóxia. O ensaio foi monitorado por sistema de imagem (*CytoSMART Live Cell Imaging System* (Lonza)) por 8 horas e fotografado a cada 30 minutos. O MC induz rápida mobilização de HUVEC logo nas primeiras horas de incubação, indicando que UC-MSC condicionadas à hipóxia produzem grandes quantidades de fatores angiogênicos, capazes de mobilizar células endoteliais à formação de estruturas rudimentares.

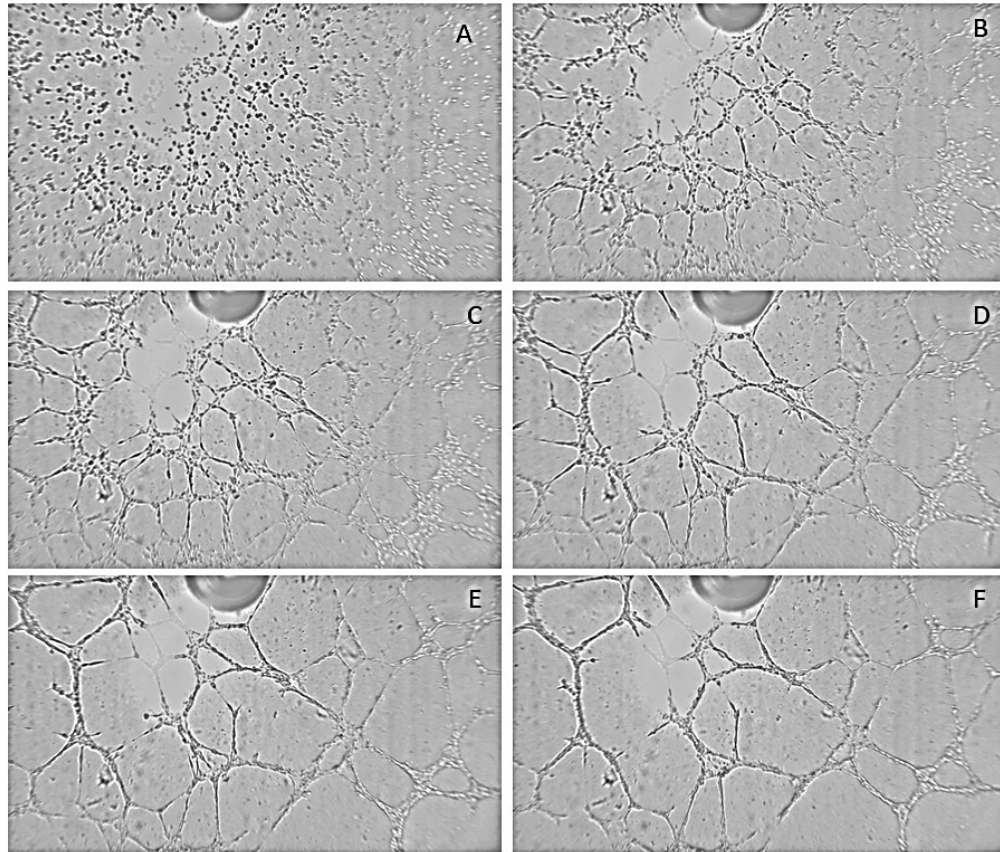


Figura 14. Dinâmica do ensaio do potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de hipóxia. Matrigel gelado foi plaqueado em placa de 96 poços, e mantido 30 minutos a 37°C para polimerização, conforme instruções do fabricante. Posteriormente, as células endoteliais foram plaqueadas a uma concentração 2×10^4 células/poço sobre o matrigel, com o MC de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia (DO 5%) suplementado com 2% SFB. As células foram fotografadas a cada 30 minutos (Cytosmart) para o monitoramento da formação de estruturas rudimentares semelhantes a capilares. (A) 0.5 hora, (B) 1 hora, (C) 2 horas, (D) 4 horas, (E) 6 horas e (F) 8 horas.

As imagens foram analisadas por *ImageJ Software*, com uso da ferramenta *Angiogenesis Analyzer*, que possibilitou a quantificação do número de segmentos, comprimento total de segmentos (soma do comprimento dos segmentos na área analisada), comprimento total (soma do comprimento de segmentos, elementos isolados e ramificações na área analisada) e número de junções (entroncamentos). A Figura 15 demonstra imagens representativas do ensaio e análise pelo *Software*. Os resultados são apresentados na Figura 16, e demonstram que o MC de UC-MSC condicionadas à hipóxia apresenta maior potencial angiogênico sob as células endoteliais, quando comparado ao das UC-MSC não pré-condicionadas ($p < 0.05$ para todas as análises), evidenciado pela maior formação de estruturas semelhantes a capilares.

Os resultados sugerem que em sistema de cultivo tridimensional e condicionadas a baixos níveis de oxigênio, semelhante ao encontrado nos tecidos *in vivo*, as UC-MSC secretam fatores angiogênicos em maiores quantidades ou maior potencial capazes de mobilizar células endoteliais.

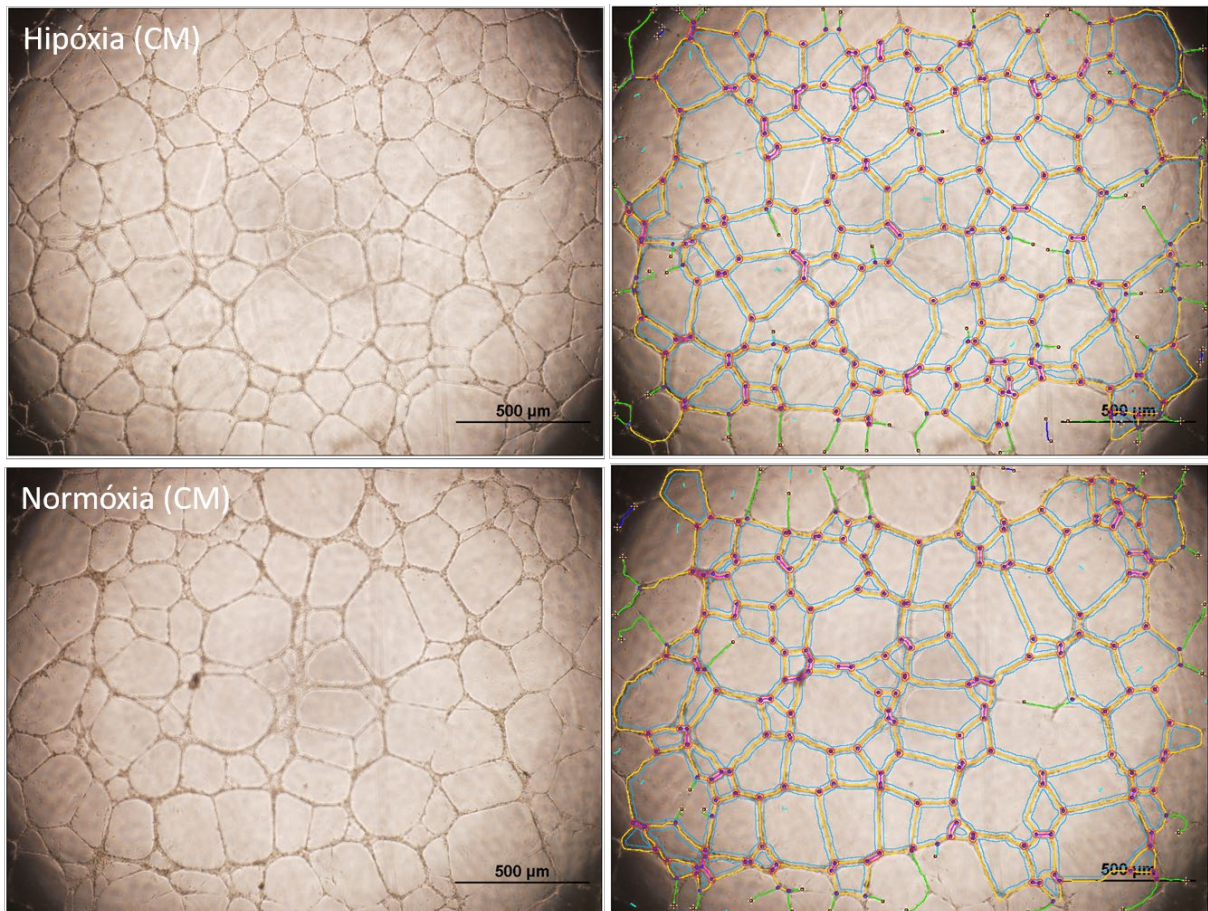


Figura 15. Imagens representativas de ensaio de potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de normóxia ou hipóxia. HUVEC foram plaqueadas a uma concentração 2×10^4 células/poço sobre o Matrigel com o MC de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia (Hipóxia-MC) ou em normóxia (Normóxia-CM). As células foram fotografadas após 15 horas de incubação para análise da formação de estruturas rudimentares semelhantes a capilares, por ImageJ Software (*Angiogenesis Analyser Tool*).

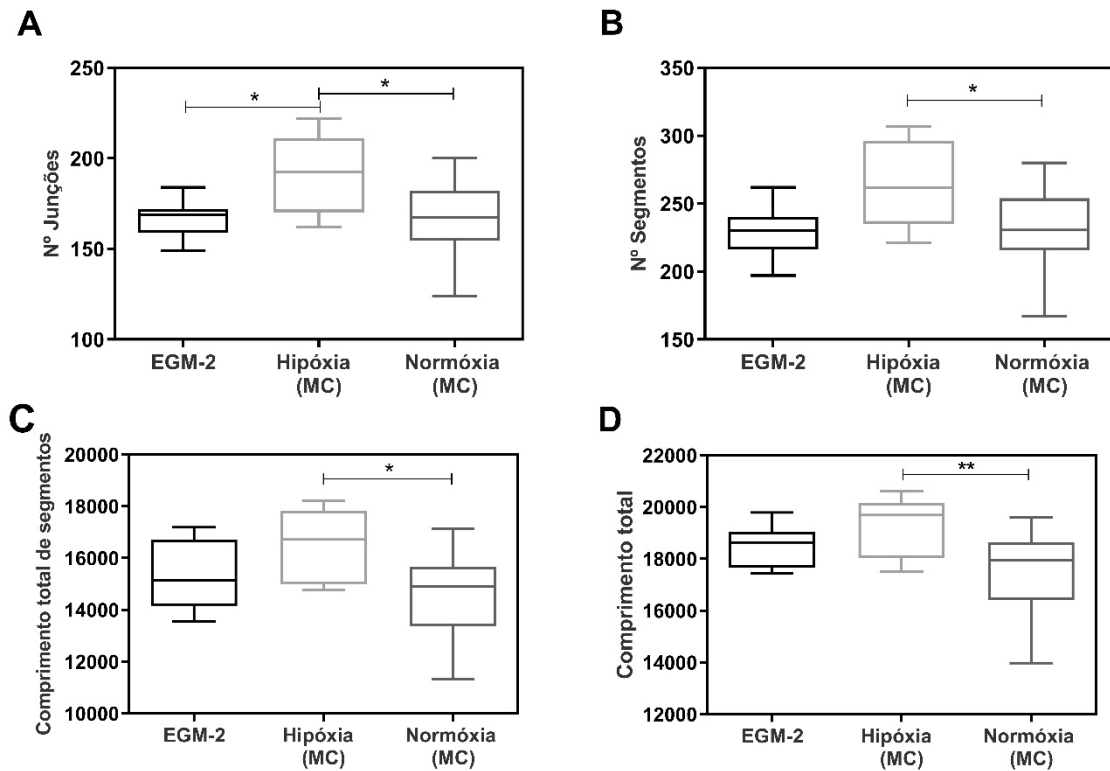


Figura 16. Potencial angiogênico dos meios condicionados de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de normóxia ou hipóxia. Matrigel gelado foi plaqueado em placa de 96 poços, e mantido 30 minutos a 37°C para polimerização, conforme instruções do fabricante. Posteriormente, as células endoteliais foram plaqueadas a uma concentração 2×10^4 células/poço sobre o matrigel, com o MC de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia (Hipóxia-MC) suplementado com 2%SFB, ou em normóxia (Normóxia-MC) 2%SFB. O meio de crescimento de HUVEC EGM-2 completo foi utilizado como controle positivo. As células foram fotografadas após 15 horas de incubação para análise da formação de estruturas rudimentares semelhantes a capilares, por ImageJ Softwar (*Angiogenesis Analyser Tool*) para quantificação (a) número de junções, (b) número de segmentos, (c) comprimento total dos segmentos e (d) comprimento total. (3 experimentos independentes, 4 replicatas). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p > 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

Ensaio para avaliação do potencial angiogênico direto das UC-MSC também foram realizados. Para isso, foram realizados co-cultivos dessas células com HUVEC em matrigel (Figura 17). No entanto, apesar de diferentes condições terem sido testadas, as UC-MSC expandidas em biorreator em normóxia ou hipóxia não induziram a formação de tubos ou estruturas semelhantes a capilares em matrigel.

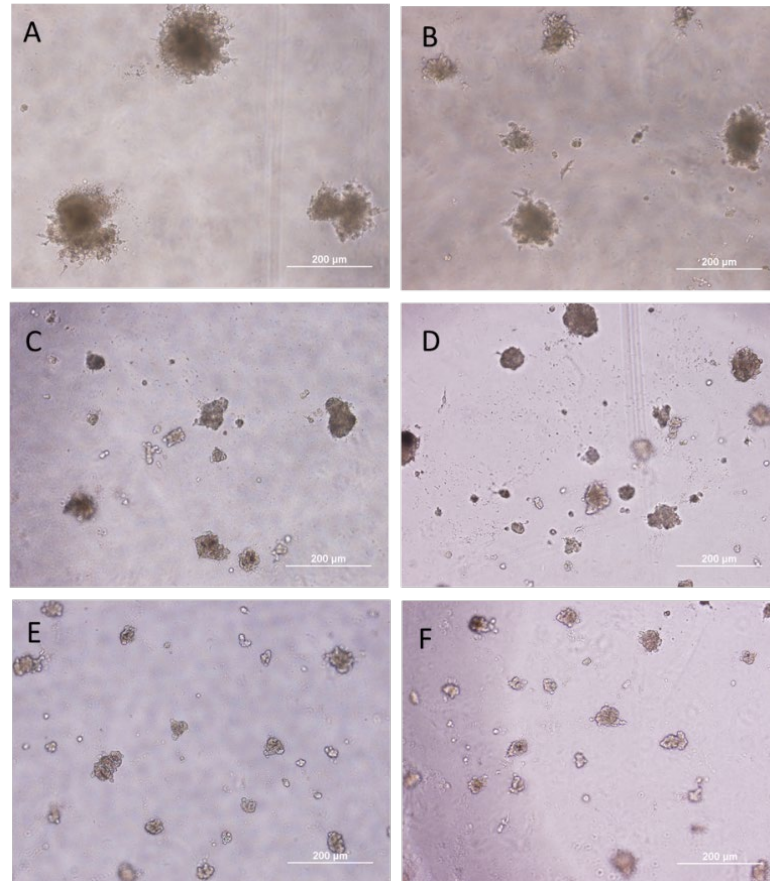


Figura 17. Potencial angiogênico de UC-MSC. Matrigel gelado foi plaqueado em placa de 96 poços, e mantido 30 minutos a 37°C para polimerização, conforme instruções do fabricante, e as células foram plaqueadas posteriormente. UC-MSC foram co-cultivadas com HUVEC nas proporções (A) (3:1) e (B) (3:2) em matrigel por 20 horas. UC-MSC foram plaqueadas sob matrigel GFR (C) ou Basement Membrane (BM) (D) e incubadas por 48 horas, em mistura EGM-2/ α MEM 10%AB (1:1), a uma concentração de 2×10^4 células por poço, nas mesmas condições foram plaqueadas em matrigel GFR (E) ou BM (F) a uma concentração de 1×10^4 células por poço.

5.1.4.2. Avaliação das propriedades imunossupressoras das UC-MSC

As UC-MSC foram avaliadas quanto à propriedade imunossupressora após cultivo em biorreator em condições de hipóxia ou normóxia. Para tal, foi realizado o ensaio de inibição da proliferação de linfócitos T. PBMC marcados com CFSE estimulados com PHA foram co-cultivados com UC-MSC (hipóxia e normóxia) por 4 dias. O corante não-fluorescente é altamente permeável à membrana celular em função dos seus grupos acetato, e no citoplasma de células viáveis o CFDA-SE é hidrolisado por esterases intracelulares, sendo convertido em sua forma fluorescente (CFSE) que se liga covalentemente a grupos amina de proteínas e peptídeos

citoplasmáticos. A cada divisão celular o CFSE é igualmente dividido entre as células-filhas, desta maneira a intensidade de fluorescência se reduz à metade a cada geração, permitindo a análise da proliferação por citometria de fluxo (Figura 18).

Pelas análises de citometria de fluxo, a partir da marcação com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, a proliferação das células T foi analisada. Para tal, são feitos um controle negativo de proliferação (PBMC marcadas com CFSE e não ativadas com PHA) (Fig. 18A) e controle positivo de proliferação (PBMC marcadas com CFSE e ativadas com PHA) (Fig.18B) (P6 no histograma). Para o cálculo do potencial de inibição, considerou-se a porcentagem de proliferação do controle positivo (proliferação), ou seja, PBMC ativadas em relação às PBMC ativadas co-cultivadas com UC-MSc. Para a análise da inibição da proliferação das células T pelas UC-MSc, utilizou-se a fórmula:

$$\frac{[\% \text{ CD3+ (CFSE low) } - \% \text{ CD3+ (CFSE low: MSC)}] * 100}{\% \text{ CD3+ (CFSE low)}}$$

Onde, CFSE *low*, reflete a diluição do CFSE pela proliferação celular, ou seja, PBMC CFSE+ PHA ativadas. Na fórmula, sendo: % **CD3 (CFSE low)** = células T CD3+ (CD4+ ou CD8+) CFSE+ PHA ativadas; % **CD3 (CFSE low: MSC)** = células T CD3+ (CD4+ ou CD8+) CFSE+ PHA ativadas que foram co-cultivadas com UC-MSc.

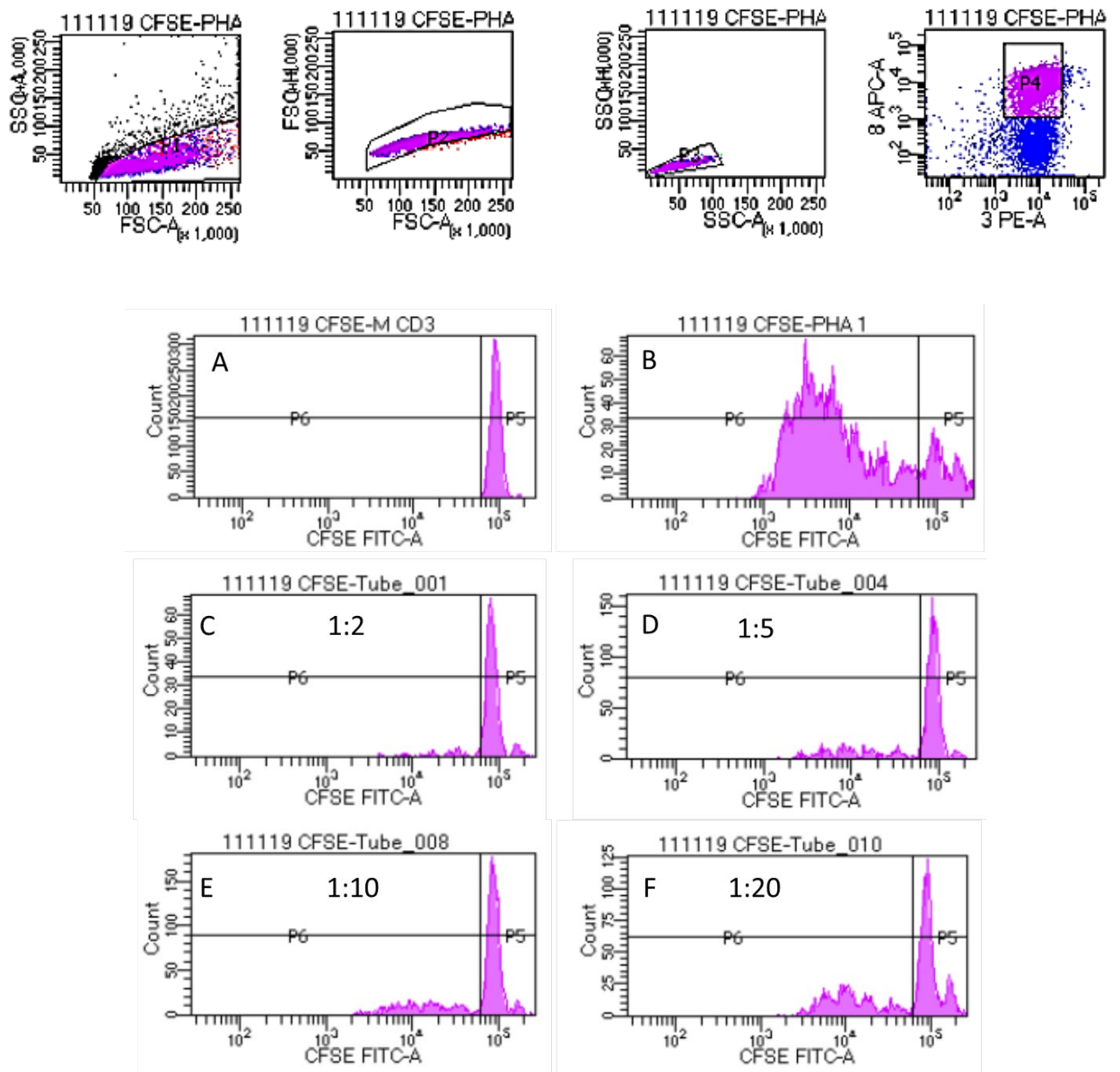


Figura 18. Histogramas representivos das análises de citometria de fluxo da inibição da proliferação de linfócitos T. UC-MSC foram co-cultivadas com PBMC marcadas com CFSE (5 μ M) em diferentes concentrações (1:2, 1:5, 1:10 e 1:20) e estimuladas com PHA (2 μ g/mL) por 4 dias. As células foram coletadas e marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD3, e analisadas por citometria de fluxo. (A) controle de marcação do CFSE, células CD3+ não ativadas, (B) controle de proliferação, células CD3+ ativadas com PHA. Células CD3+ que foram co-cultivadas com UC-MSC nas proporções (C) 1:2, (D) 1:5, (E) 1:10 e (F) 1:20.

Os resultados dos co-cultivos demonstraram que UC-MSC pré-condicionadas com hipóxia inibem eficientemente a proliferação de células T, semelhante às UC-MSC cultivadas em normóxia (Figura 19). O potencial de inibição de T CD4+ na proporção de 1:2 foi de $66,35 \pm 1,12\%$ para as UC-MSC cultivadas em normóxia e $77,65 \pm 10,8\%$ para as UC-MSC condicionadas à hipóxia (Fig. 19A), enquanto para as

células T CD8+ mostraram potencial de inibição de $68,5 \pm 18,5\%$ e $70,4 \pm 19\%$, na mesma proporção (Fig. 19B), respectivamente.

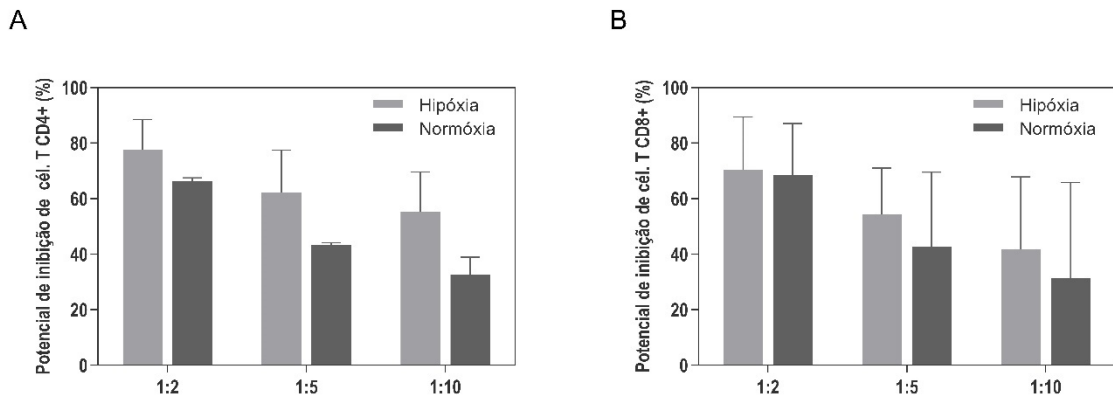


Figura 19. Potencial de inibição da proliferação de linfócitos por UC-MSC cultivadas em biorreator. UC-MSC expandidas em biorreator em hipóxia (barras cinza claro) e normóxia (barras cinza escuro) foram co-cultivadas com PBMC marcados com CFSE (5 μ M) e estimulados PHA (2 μ g/mL) em diferentes proporções. Os resultados são referentes ao 4º dia de co-cultivo e o potencial de inibição de células T CD4+ (A) e T CD8+ (B) são apresentados. Para o cálculo do potencial de inibição foi utilizada a seguinte fórmula: $[(\% \text{ células CD3} + \text{CFSE low} - \% \text{ células CD3} + \text{CFSE low co-cultivadas com UC-MSC}) / \% \text{ células CD3} + \text{CFSE low}] * 100$. Os experimentos foram realizados em triplicata. (n = 3, três doadores diferentes). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste T de Student foi o teste estatístico paramétrico utilizado para a comparação de 2 grupos independentes.

5.2. PARTE II

5.2.1. Pré-condicionamento de UC-MSC expandidas em biorreator de tanque agitado em normóxia ou hipóxia com IL-17

A UC-MSC foram inoculadas em biorreator de tanque agitado nas condições anteriormente utilizadas para os ensaios em normóxia e hipóxia com a adição de interleucina-17 recombinante em concentração de 50 ng/mL para avaliar o efeito sinérgico do pré-condicionamento com um estímulo inflamatório e condição de hipóxia. UC-MSC apresentaram eficiência de adesão similar aos microcarregadores revestidos com colágeno humano (SphereCol) para as duas condições após 24 horas, sendo que para os cultivos com IL-17/Hipóxia (5% O_2), a eficiência de adesão foi de $69,95 (\pm 0,05) \%$ e para os cultivos com IL-17/Normóxia (20% O_2) foi de $60,12 (\pm 8,5) \%$, semelhante à eficiência de adesão dos ensaios em normóxia e hipóxia sem o

estímulo com a IL-17. Desta forma, o *priming* das UC-MSCs com estímulo inflamatório não influenciou a adesão das células aos microcarregadores.

A Figura 20 apresenta o perfil de expansão das UC-MSCs cultivadas por 05 dias com IL-17 em biorreator em hipóxia ou normóxia, e os cultivos controles sem a citocina inflamatória. O pré-condicionamento inflamatório não induziu maior expansão das UC-MSCs no sistema de cultivo em biorreator de tanque agitado, tanto em hipóxia quanto em normóxia, apresentando rendimento celular e fator de expansão similar ao apresentado pelos cultivos na ausência da citocina. Ao final do cultivo, obteve-se uma concentração celular de $1,63 (\pm 0,55) \times 10^5$ células/mL dos cultivos com IL-17 em hipóxia e $1,9 (\pm 0,31) \times 10^5$ células/mL dos ensaios em normóxia, o que corresponde a um fator de expansão de $5,74 (\pm 1,14)$ e $7,88 (\pm 0,67)$ vezes, respectivamente, considerando o número de células que aderiram com sucesso aos microcarregadores após 24 horas. O fator de expansão celular foi ligeiramente superior nos ensaios com pré-condicionamento com a citocina em normóxia, quando comparado ao *priming* combinado com IL-17 e hipóxia, porém sem diferença estatística. O mesmo perfil foi observado nos controles normóxia e hipóxia. A eficiência de recuperação celular ao fim do processo de expansão não foi influenciada pelo pré-condicionamento com a citocina, e foi semelhante para as duas condições, sendo $73,30 (\pm 6,62)$ para a condição IL-17/Hipóxia e de $64,69 (\pm 11,30)$ para IL-17/Normóxia, também sem diferença quando comparado aos respectivos controles.

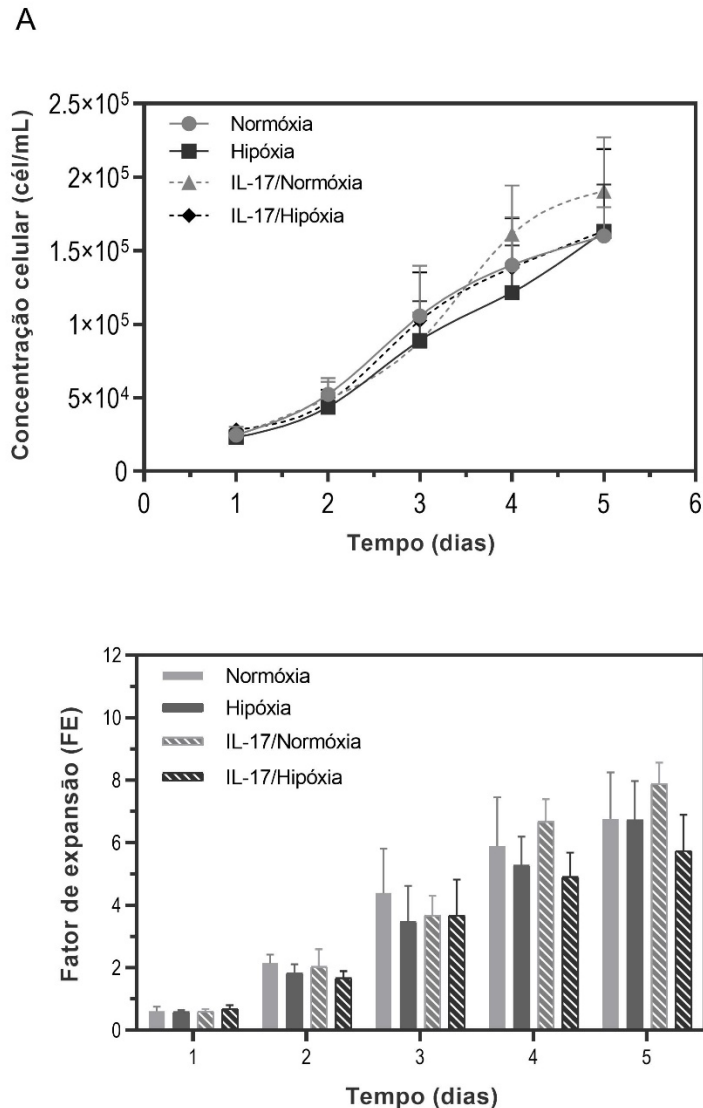


Figura 20. Expansão de UC-MSC em biorreator de tanque agitado e pré-condicionamento com Interleucina-17 em normóxia ou hipóxia. As células foram inoculadas a densidade inicial de 4×10^4 células/mL ancoradas aos microcarregadores (5 g/L) (volume de trabalho de 200 mL) em meio α -MEM 10% AB acrescido de 50 ng/ml de citocina recombinante IL-17A. As células foram submetidas a uma fase de adesão com agitação intermitente nas primeiras 4 horas após o inóculo. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida a 5% (hipóxia) ou 20% (normóxia). (A) Perfil de crescimento das UC-MSC demonstrando concentração celular (células/mL). (B) Fator de expansão durante 05 dias de cultivo. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$, três diferentes doadores). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste ANOVA two way (paramétrico) foi utilizado para a comparação de 3 ou mais grupos independentes. O teste de comparações múltiplas de Tukey (ou de Sidak) foi empregado para comparações de 2 grupos.

A morfologia e colonização dos microcarregadores foi acompanhada pela coloração de células viáveis pelo FDA, evidenciando o ancoramento e colonização gradual dos microcarregadores pelas UC-MSC durante o cultivo em biorreator ao

longo do tempo. A Figura 21 mostra imagens de UC-MSC cultivadas com IL-17 em condição de hipóxia (*priming* combinado) por 05 dias de cultivo após coloração com FDA.

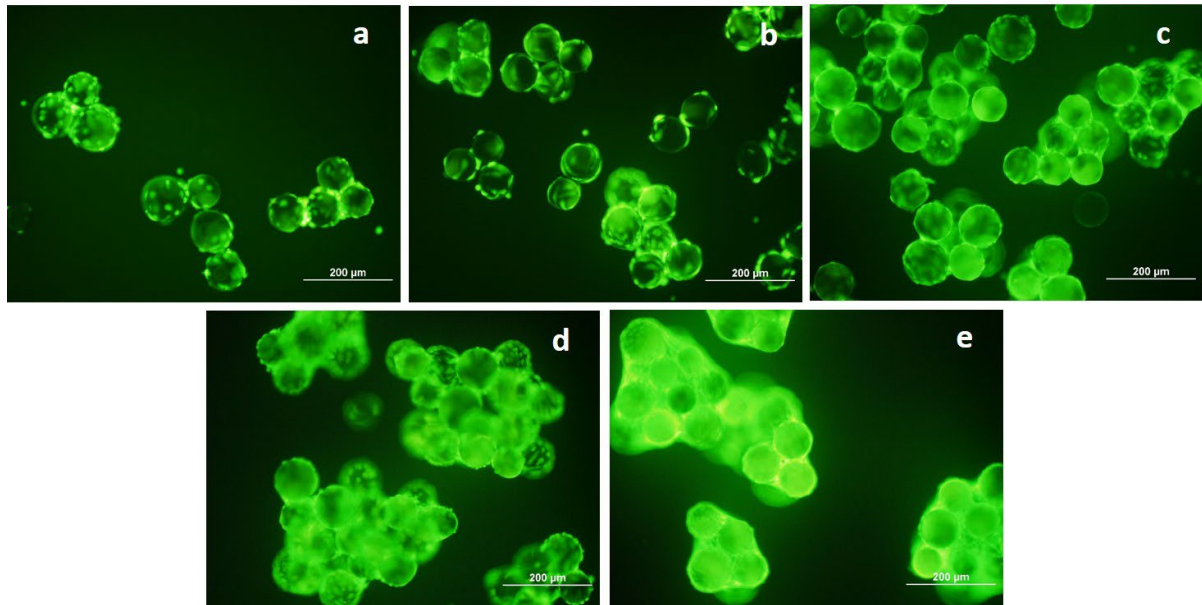


Figura 21. Imagens representativas das UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 e hipóxia (*priming* combinado) em biorreator de tanque agitado após coloração com o corante FDA. As amostras foram coletadas e coradas para visualização das células viáveis aderidas aos microcarregadores, no dia 1 (a), dia 2 (b), dia 3 (c), dia 4 (d) e dia 5 (e) após início do cultivo.

As análises de metabolismo das UC-MSC cultivadas com IL-17 em normóxia ou hipóxia são apresentadas na Figura 22. A concentração de glicose (Figura 22A) e lactato (Figura 22B) dos ensaios de pré-condicionamento com a IL-17 seguiram perfil semelhante aos controles (normóxia e hipóxia), com consumo gradual de glicose e produção de lactato. O pré-condicionamento combinado com IL-17/Hipóxia apresentou níveis de concentração de lactato ligeiramente superior (Figura 22B) especialmente nos dias 4 e 5 de cultivo, porém sem diferença estatística. Em seguida, foram calculadas as taxas de consumo específicas de glicose (Figura 22C) e as taxas específicas de produção de lactato (Figura 22D). As UC-MSC pré-condicionadas com hipóxia apresentaram valores mais altos da taxa específica de consumo de glicose nos primeiros dois dias de cultivo, com diferença estatística no primeiro dia comparado aos cultivos combinados com IL-17. A qGli para os ensaios em normóxia (IL-17/Normóxia) foi de $15,58 \pm 11,9$ pmol/célula.dia e de $18,51 \pm 11,15$ pmol/célula.dia

para os cultivos com *priming* combinado em hipóxia (IL-17/Hipóxia) (* $p < 0,05$). No segundo dia de cultivo, este perfil se manteve ($p < 0,001$) (teste de comparações múltiplas de Sidak). No entanto, os valores tornaram-se semelhantes nos dias seguintes para todas as condições, bem como para as taxas de produção de lactato. Os valores de taxa de produção de lactato (qLac) assim como rendimento aparente de lactato a partir de glicose (Ylac/gli), não apresentaram diferença estatística entre os diferentes grupos.

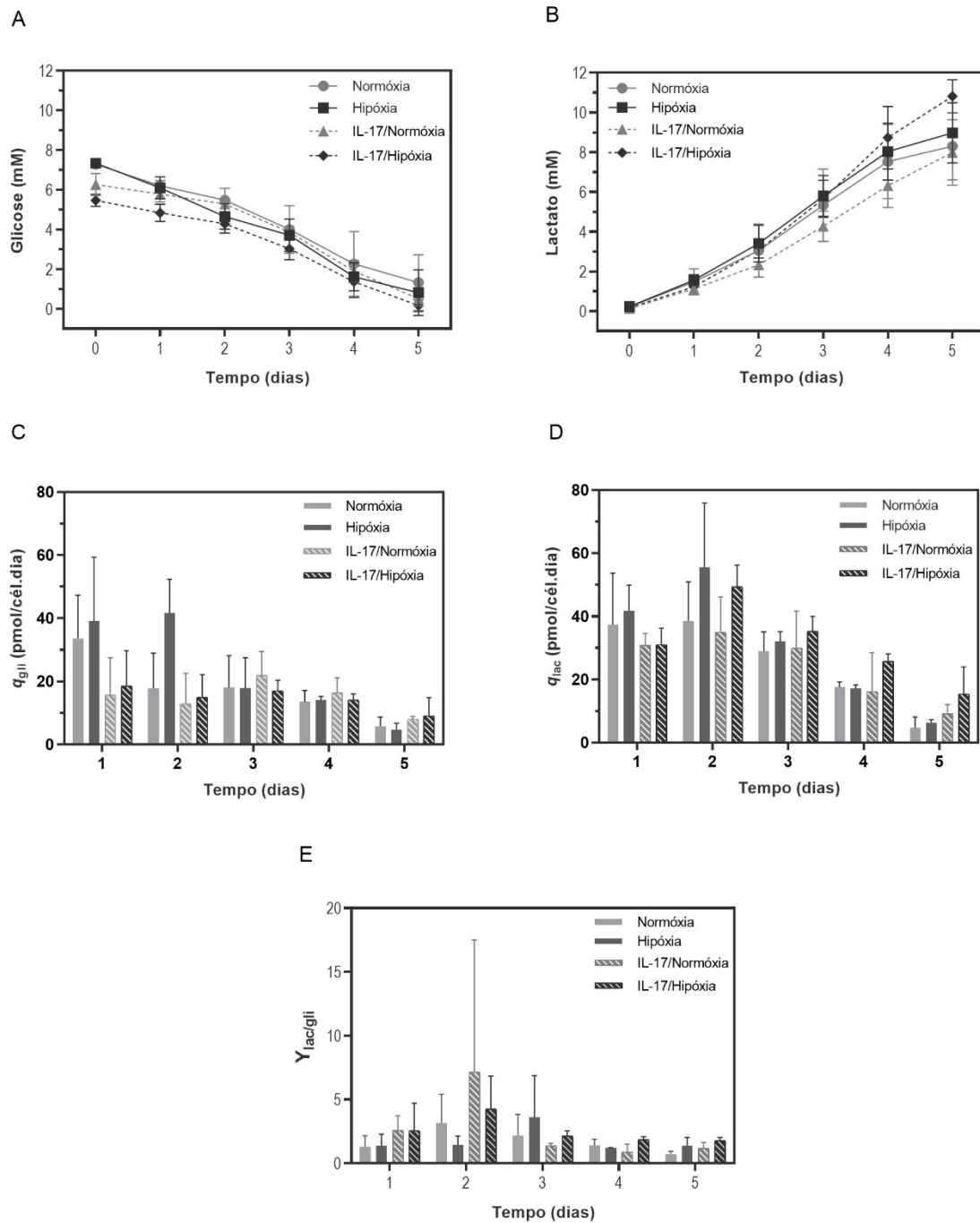


Figura 22. Análise metabólica das UC-MSC expandidas em biorreator de tanque agitado em normoxia (DO 20%) ou hipoxia (DO 5%) e condicionadas com IL-17. Perfil de concentração de (A) glicose e (B) lactato produzido por UC-MSC em 5 dias de cultivo celular; (C) Taxa específica de consumo de glicose e (D) taxa de produção de lactato. (E) Rendimento aparente de lactato a partir de glicose ($Y_{lac/gli}$). Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$, dois doadores diferentes). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste ANOVA two way (paramétrico) foi utilizado para a comparação de 3 ou mais grupos independentes. O teste de comparações múltiplas de Tukey (ou de Sidak) foi empregado para comparações de 2 grupos.

5.2.2. Caracterização das UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17

As UC-MSc cultivadas em normóxia e hipóxia em biorreator de tanque agitado, pré-condicionadas ou não com IL-17, foram analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de antígenos de superfície. Os resultados são apresentados na Tabela 1. O pré-condicionamento com a citocina inflamatória IL-17 não alterou a expressão dos marcadores comparado aos níveis de expressão pré-expansão em biorreator e controles (normóxia e hipóxia). Altos níveis de expressão foram observados para os marcadores CD90, CD73, CD44, CD13, CD49e, CD29, assim como para CD105 e CD166, que haviam apresentado ligeira diminuição da expressão nos ensaios anteriores, devido ao processo de *harvest*, como observado em estudos prévios com uso de microcarregadores. Também foi observada baixa ou ausência de expressão de CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR.

	Pré-expansão		Normóxia		Hipóxia		IL-17/Normóxia		IL17/Hipóxia	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
CD166	84,31	17,94	90,37	3,81	90,05	10,67	94,1	5,37	95,03	0,35
CD105	92,33	6,61	79,74	7,55	87,07	16,73	98,66	2,13	98,43	0,49
CD90	98,38	0,24	98,27	0,77	98,93	0,52	99,5	0,78	99,3	0,26
CD73	92,7	4,24	95,67	0,43	98,34	1,35	94,8	7,41	99	0,44
CD49e	97,57	0,52	91,37	0,72	98,13	1,64	99,1	1,22	98,46	0,77
CD44	90,95	10,99	92,07	3,06	96,01	4,93	95,96	3,02	83,6	18,92
CD29	98,04	1,6	97,21	0,55	99,29	0,29	99,1	1,38	96,63	3,85
CD13	97,14	0,91	96,73	0,78	98,99	0,57	99,13	1,17	98,3	0,55
CD45	0	0	0,3	0,06	0,14	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05
CD14	0,75	0,69	4,08	4,05	1,25	0,07	0,46	0,2	0,2	3,39
CD34	0,38	0,34	2,93	2,82	0,53	0,19	0,33	0,05	0,4	0,26
CD31	0,11	0,1	0,96	0,82	0,15	0,06	0,23	0,05	0,1	1,69
HLA-DR	0,51	0,45	2,55	2,1	0,7	0,14	0,06	0,05	0,1	0,1

Tabela 1. Perfil imunofenotípico de UC-MSc pré e pós-cultivo em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. As UC-MSc foram incubadas com os anticorpos monoclonais para a análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo. Os valores são apresentados com média \pm desvio padrão (DP). O teste ANOVA two way (paramétrico) foi utilizado para a comparação de 3 ou mais grupos independentes. O teste de comparações múltiplas de Tukey (ou de Sidak) foi empregado para comparações de 2 grupos.

UC-MSC cultivadas em biorreator em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17 foram submetidas aos ensaios de diferenciação multipotencial, com objetivo de avaliar se o potencial de diferenciação multilinhagem é mantido pós-expansão das células em biorreator de tanque agitado em diferentes condições de saturação de oxigênio e estímulo inflamatório. Como demonstrado na Figura 23, as UC-MSC mantiveram potencial de diferenciação nas três linhagens avaliadas: adipogênica, evidenciada pela formação de gotículas lipídicas no citoplasma das células após coloração Sudan-II Scarlet, osteogênica evidenciada pela formação de matriz mineralizada após coloração de von Kossa e a diferenciação condrogênica evidenciada pela formação de proteoglicanos após coloração com Alcian Blue. As células cultivadas nas diferentes condições apresentaram níveis de diferenciação semelhantes. O pré-condicionamento com IL-17 aparentemente não inibiu a diferenciação adipogênica e condrogênica, assim como não aumentou a diferenciação osteogênica. No entanto, os ensaios utilizados de diferenciação celular seguido de coloração são apenas qualitativos. Portanto, ensaios mais refinados, tal como análise da expressão de genes associados à diferenciação, podem contribuir para melhor entendimento da influência do pré-condicionamento com hipóxia com ou sem IL-17 no potencial de diferenciação das UC-MSC.

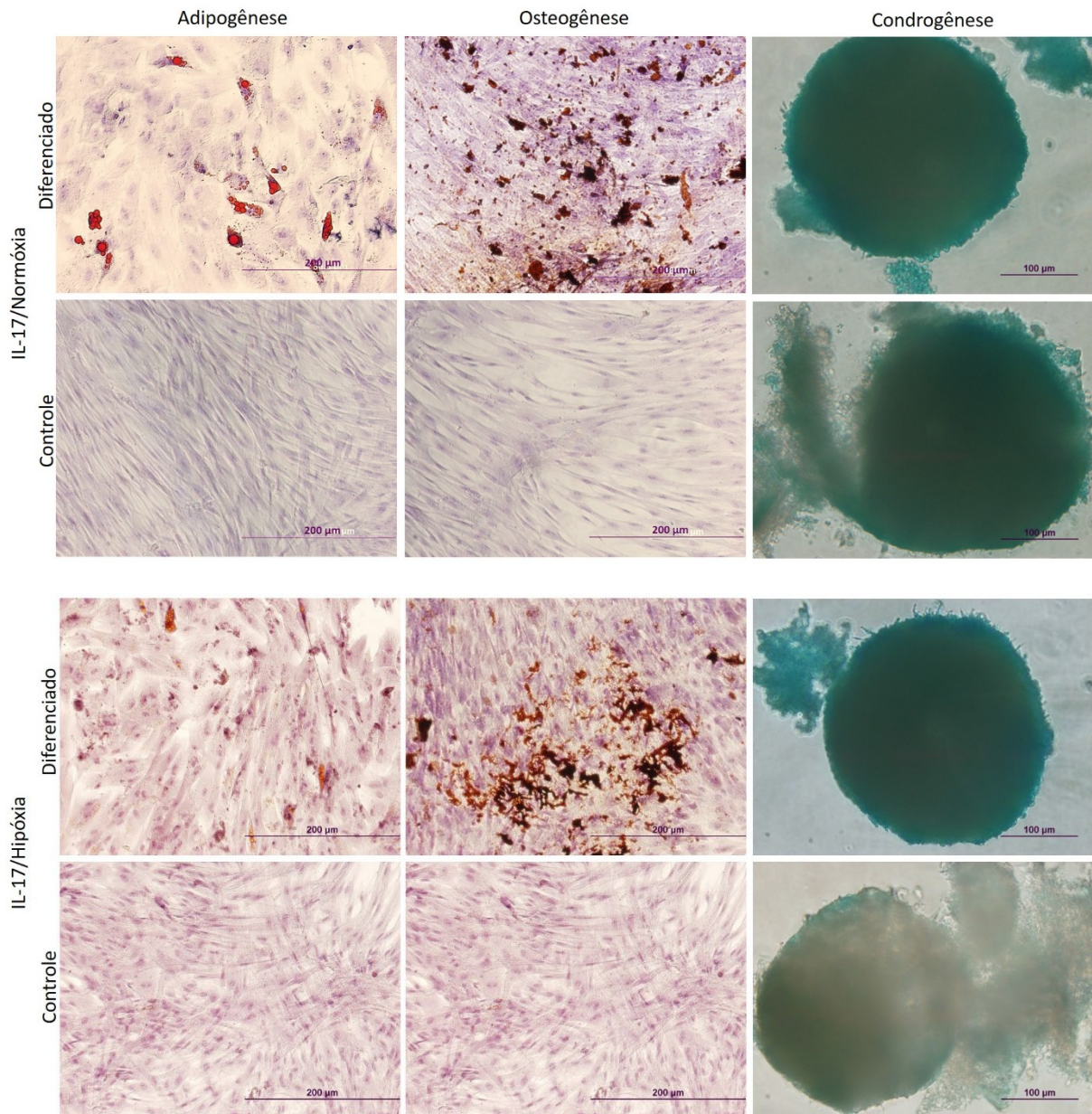


Figura 23. Análise de multipotencialidade de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. Após 14 dias de indução, a diferenciação adipogênica foi evidenciada pela formação de gotículas lipídicas (Sudan-II Scarlate staining), a diferenciação osteogênica evidenciada pela formação de matriz mineralizada (von Kossa staining) e a diferenciação condrogênica evidenciada pela formação de proteoglicanos (alcian blue staining).

5.2.3. Potencial angiogênico de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17

Os meios condicionados (MC) das quatro condições de cultivo realizadas (Normóxia, Hipóxia, Normóxia/IL-17, Hipóxia/IL-17) foram utilizados para avaliar o efeito parácrino do secretoma das UC-MSc na migração de HUVEC. A taxa de migração das HUVEC foi calculada com o programa ImageJ, delimitando a área do *scratch* em 0 hora e após 20 horas de incubação com os diferentes MC. Foram realizados dois experimentos independentes com 5 replicatas.

O MC das UC-MSc pré-condicionadas com a citocina IL-17 não induziu a maior migração de HUVEC em nenhuma das condições de saturação de oxigênio (hipóxia ou normóxia). O MC das UC-MSc cultivadas com Normóxia/IL-17 inibiu significativamente o potencial de migração de HUVEC quando comparado ao MC do cultivo das células em hipóxia, 28,4% ($\pm 0,04$) e 65% ($\pm 0,04$), respectivamente. O MC das células pré-condicionadas com IL-17/Hipóxia (*priming* combinado) aumentou ligeiramente o potencial de migração quando comparado ao MC das células pré-condicionadas com IL-17/Normóxia, equiparando-se a condição de cultivo em normóxia, porém, não foi detectada diferença estatística entre esses grupos (Figura 24).

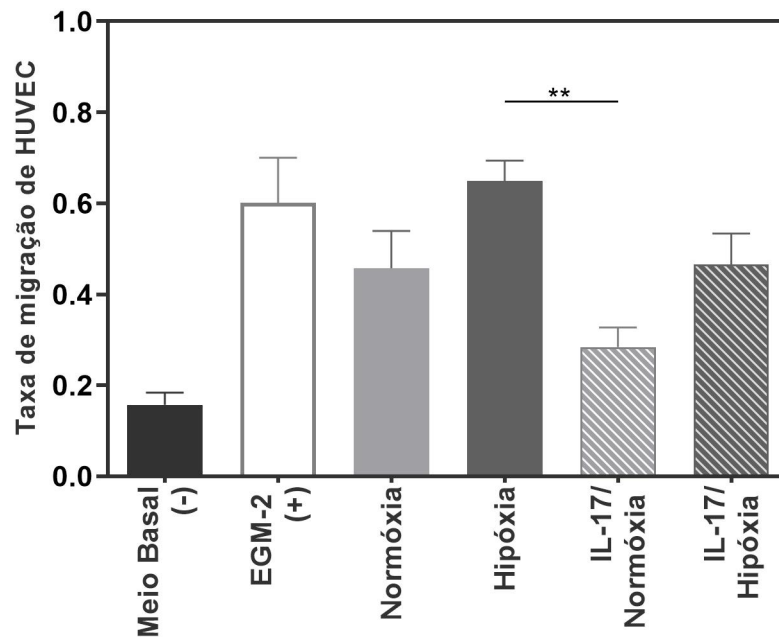


Figura 24. Efeito do meio condicionado de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17, na migração de HUVEC. Após o *scratch*, as HUVEC foram mantidas com MC das UC-MSC condicionadas ou não com IL-17 em biorreator em hipóxia (*priming* combinado) ou normóxia por 20 horas. As áreas do *scratch* em 0h e 20h foram utilizadas para determinação da taxa de migração em ImageJ Software, definida pelo cálculo: $(blank\ area\ on\ 0\ h - blank\ area\ on\ 24\ h) / blank\ area\ on\ 0\ h$. Foram realizados 2 experimentos independentes com 5 replicatas cada. Os resultados são apresentados como média +/- desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p > 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

Foi realizado o ensaio de angiogênese em meio Matrigel (GFR) para avaliar o potencial do secretoma de UC-MSC expandidas em diferentes de normóxia ou hipóxia, na presença ou ausência de IL-17 (Figura 25). As HUVEC foram plaqueadas em placas de 96 poços sobre o matrigel e incubadas por 15 horas a 37° C com os diferentes MC, e então fotografadas. As imagens foram analisadas por *ImageJ/Angiogenesis Analyzer* para avaliação da formação e quantificação de estruturas/tubos capilares. Os dados foram normalizados para possibilitar a comparação dos experimentos com HUVEC de doadores diferentes. Em concordância com os ensaios de migração de HUVEC, o MC das UC-MSC cultivadas com IL-17/Normóxia inibiu consideravelmente a formação de estruturas capilares quando

comparado às demais condições, especialmente com os cultivos em hipóxia ($p > 0,001$ e $p > 0,0001$).

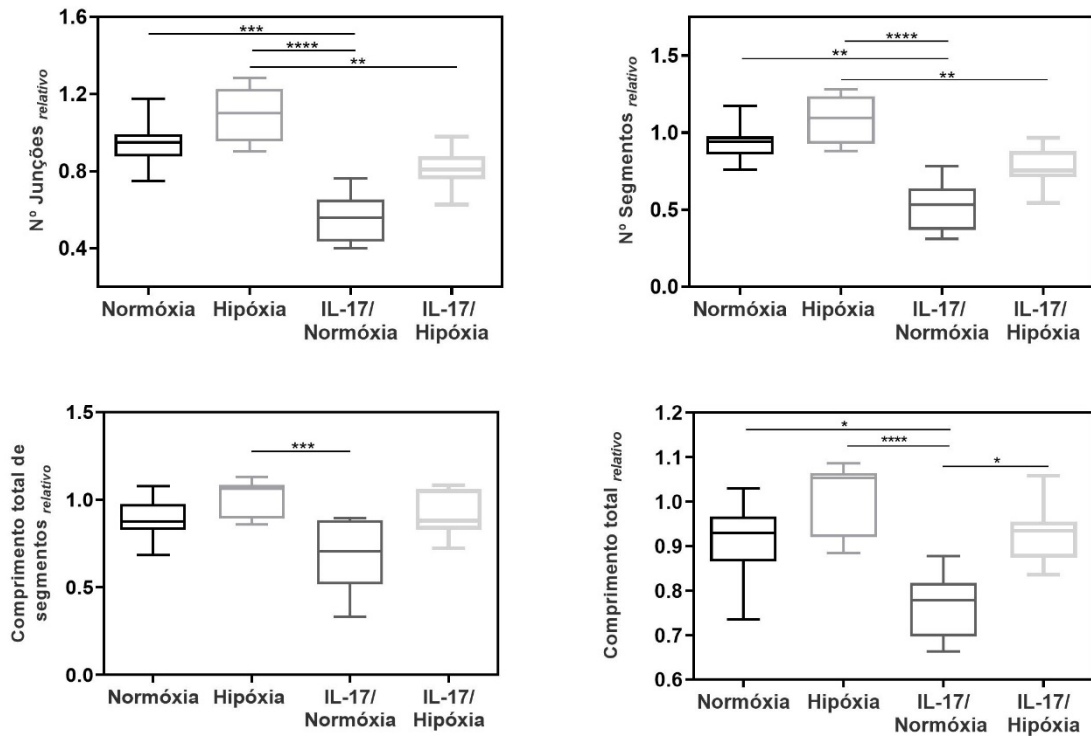


Figura 25. Potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. Matrigel gelado foi plaqueado em placa de 96 poços, e mantido 30 minutos a 37°C para polimerização, conforme instruções do fabricante. Posteriormente, as células endoteliais foram plaqueadas a uma concentração 2×10^4 células/poço sobre o Matrigel, com o meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator condicionadas ou não com IL-17 em condições de normóxia e hipóxia, suplementado com 2% SFB. O meio de crescimento EGM-2 completo foi utilizado como controle positivo. As células foram fotografadas após 15 horas de incubação para análise da formação de estruturas rudimentares semelhantes a capilares por ImageJ Software, usando a ferramenta *Angiogenesis Analyser*, para quantificação (a) número de junções, (b) número de segmentos, (c) comprimento total de segmentos e (d) comprimento total. Foram utilizados MC de três experimentos independentes, e 6 replicatas experimentais para cada condição, em dois experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, referente aos valores relativos após normalização. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p > 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

5.2.4. Propriedade imunossupressora de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17

As UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em quatro diferentes condições de cultivo (Normóxia, Hipóxia, Normóxia/IL-17, Hipóxia/IL-17), foram co-cultivadas por 4 dias com PBMC marcadas com CFSE e ativadas com PHA para avaliação do potencial imunossupressor sobre proliferação de células T CD3+. Os resultados são apresentados na Figura 26. Não foram identificadas diferenças estatísticas entre as diferentes condições. As UC-MSc condicionadas com IL-17 em hipóxia (*priming* combinado) apresentaram inibição ligeiramente superior, 89,22% ($\pm 4,85$), quando comparado às demais condições, especialmente às UC-MSc cultivadas em normóxia, 67,43% ($\pm 10,4$), na proporção 1:2 (MSC:PBMC), no entanto, sem diferença estatística.

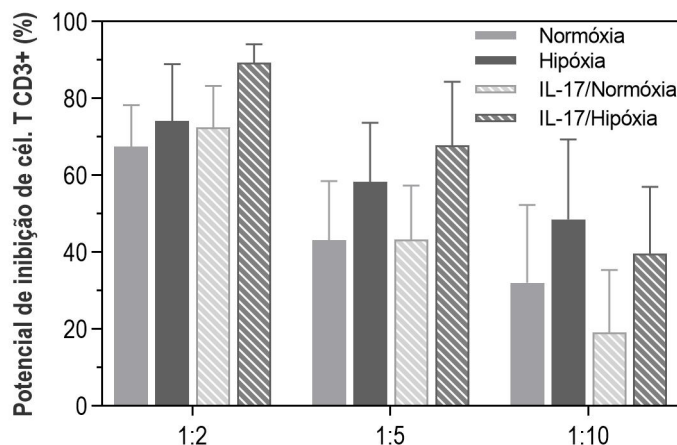


Figura 26. Potencial de inibição da proliferação de linfócitos de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. UC-MSc condicionadas ou não com IL-17 em biorreator em normóxia ou hipóxia foram co-cultivadas com PBMC marcados com CFSE (5 μ M) em diferentes concentrações e estimulados PHA (2 μ g/mL). Os resultados são referentes ao 4º dia de co-cultivo e o potencial de inibição de células T CD3+ são apresentados. Para o cálculo do potencial de inibição foi utilizada a seguinte fórmula: $[(\% \text{ células CD3+ CFSE low} - \% \text{ células CD3+ CFSE low co-cultivadas com UC-MSc}) / \% \text{ células CD3+ CFSE low}] * 100$. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste ANOVA two way (paramétrico) foi utilizado para a comparação de 3 ou mais grupos independentes. O teste de comparações múltiplas de Tukey (ou de Sidak) foi empregado para comparações de 2 grupos.

5.2.5. Análise do secretoma das UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17

O MC das UC-MSc cultivadas em biorreator nas diferentes condições (Hipóxia, Normóxia, IL-17/Hipóxia e IL-17/Normóxia) foi submetido a um imunoenensaio de membrana para análise UC-MSc da expressão semiquantitativa de várias proteínas relacionadas a angiogênese (*Human Angiogenesis Proteome Array*, R&D Systems). Os MC foram centrifugados para remoção de debris celulares e foram submetidos aos ensaios conforme instruções do fabricante. Através dos sinais produzidos pelo reagente de detecção após revelação, as imagens foram usadas para determinação dos valores relativos, conforme intensidade de pixels determinada por ImageJ, para determinação dos analitos ligados à membrana. A Figura 27 mostra o perfil de expressão dos fatores nas diferentes condições. Os controles positivos são apresentados nas extremidades superiores, e extremidade inferior à esquerda, enquanto o controle negativo encontra-se na extremidade inferior direita de cada membrana. Encontram-se destacados nas imagens, em retângulo tracejado, as áreas correspondentes a detecção da proteína VEGF (Figura 27).

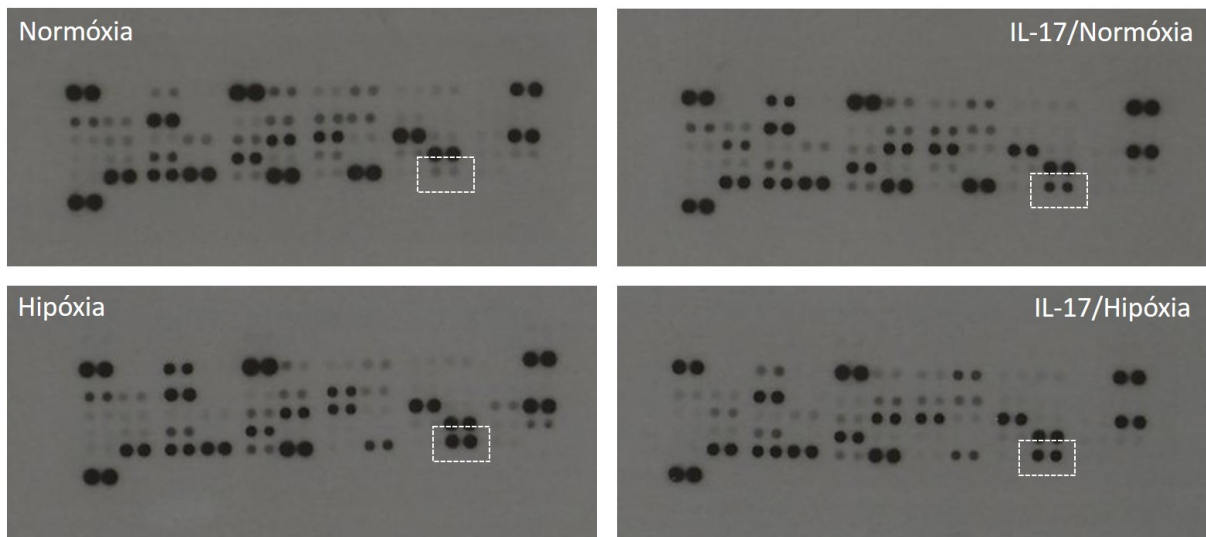
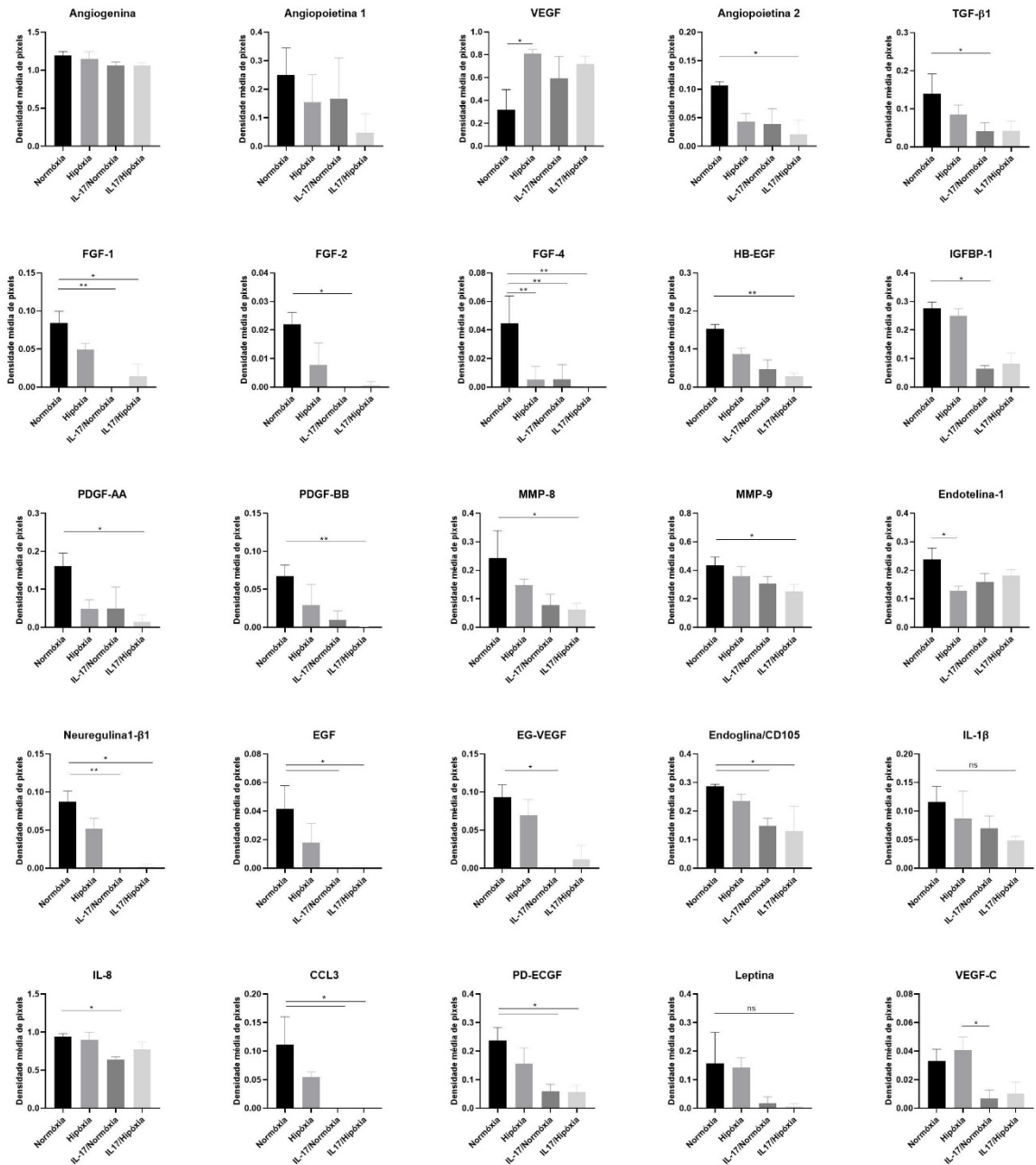


Figura 27. Perfil de expressão de proteínas relacionadas a angiogênese no secretoma de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. Imagens representativas do imunoenensaio de membrana (*Human Angiogenesis Proteome Array*, R&D Systems) demonstrando o perfil de secreção de fatores solúveis de UC-MSc de um mesmo cordão umbilical cultivadas em biorreator em normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas com IL-17 ou não. Os retângulos tracejados indicam as áreas correspondentes a detecção da proteína VEGF.

O imunoensaio permite a análise do perfil de expressão de 55 proteínas relacionadas à angiogênese, que foram classificadas como pró-angiogênicas, anti-angiogênicas ou outras. Das proteínas detectadas, 39 estão apresentadas na Figura 28. A expressão das proteínas pró-angiogênicas (Figura 28A) Angiogenina e Angiopoetina-1 não apresentou diferença entre as diferentes condições de condicionamento. No entanto, o pré-condicionamento combinado com IL-17/Hipóxia reduziu ligeiramente a expressão de Angiopoetina-1 quando comparado às demais condições, porém sem diferença estatística. Em contrapartida, a expressão de VEGF aumentou significativamente no MC das UC-MSC cultivadas em Hipóxia, quando comparado à condição em Normóxia. O VEGF-C também apresentou níveis aumentados em Hipóxia, quando comparado à condição de IL-17/Normóxia. O pré-condicionamento combinado com IL-17/Hipóxia aumentou a expressão de VEGF alcançando níveis similares ao pré-condicionamento somente com Hipóxia, no entanto, sem diferença estatística em comparação com as outras condições.

Na Figura 28A pode-se observar que secreção de todos os outros fatores pró-angiogênicos analisados foram inibidos pelo pré-condicionamento com IL-17, em condição de normóxia e/ou hipóxia, tais como Angiopoetina-2, HGF, FGF-, HB-EGF e EGF, apresentando níveis mais elevados em Normóxia, diferentemente do que ocorre com o VEGF. O condicionamento com IL-17 também não induziu maior secreção de fatores anti-angiogênicos quando comparado aos níveis detectados em hipóxia e normóxia, com exceção dos níveis de Angiostatina/Plasminogênio, que aparecem ligeiramente aumentados nos MC dos cultivos com IL-17, porém sem diferença estatística. Outras moléculas classificadas anti-angiogênicas, tais como ADAMTS-1 e TSP-2, aparecem significativamente reduzidas pelo pré-condicionamento com IL-17 quando comparado aos cultivos em Normóxia e Hipóxia.

A



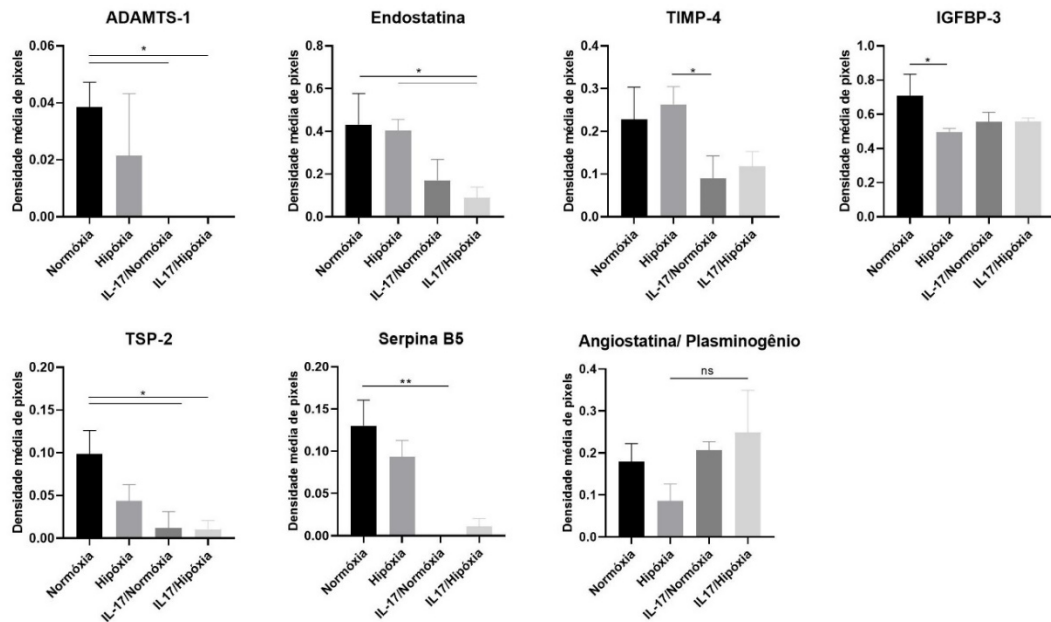
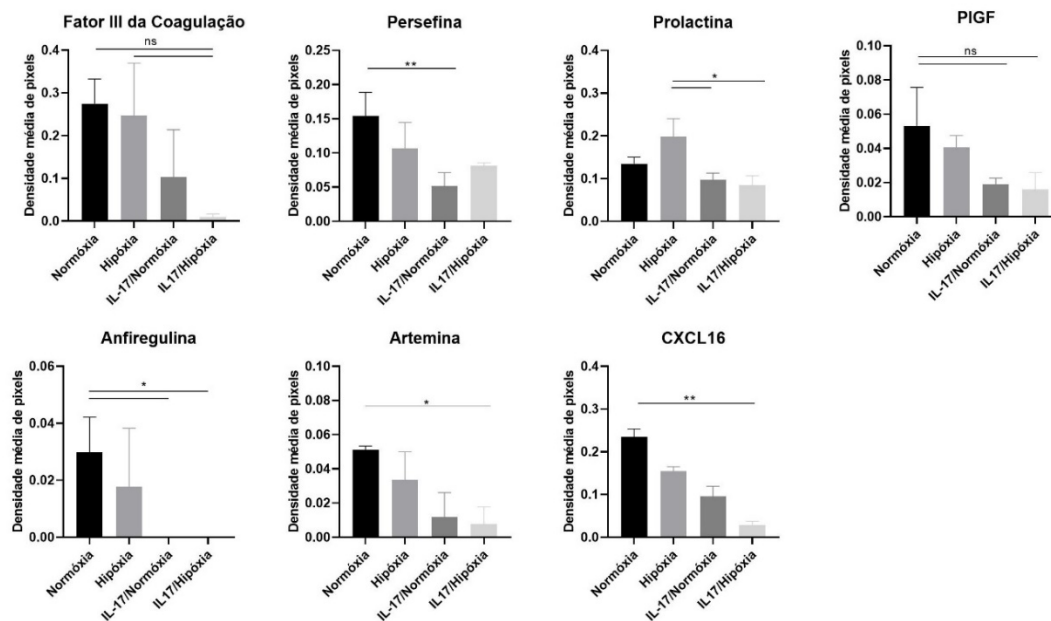
B**C**

Figura 28. Perfil de proteínas angiogênicas no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. Foi utilizado um imunoenensaio de membrana (*Human Angiogenesis Proteome Array*, R&D Systems) e para quantificação de 55 proteínas no meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator de tanque agitado em condições de Normóxia ou Hipóxia, e pré-condicionadas com IL-17 ou não. As proteínas detectadas foram categorizadas como (A) pró-angiogênicas (B) anti-angiogênicas e (C) outras. (n=2). As barras verticais correspondem a densidade média de pixels. As diferenças foram consideradas significativas quando. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p > 0,05$), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

O MC dos cultivos em biorreator também foram submetidos a imunoensaio para a detecção de 105 analitos entre citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas pelo kit *Human XL Cytokine Array* (R&D Systems). O perfil de citocinas na membrana está demonstrado na Figura 29, na qual se encontram destacadas em retângulo branco tracejado, as áreas de detecção dos fatores G-CSF (fator estimulador de colônias granulocíticas), GDF-15/MIC-1 (fator de crescimento/diferenciação-15/ citocina-1 inibidora de macrófago) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). Os níveis relativos de expressão foram quantificados e comparados entre os grupos. Dentre as proteínas detectadas, 53 foram categorizadas como pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, pleitrópicas e outras, estão apresentados na Figura 30.

O pré-condicionamento com IL-17, de maneira geral, diminuiu significativamente a expressão de citocinas/quimiocinas de perfil inflamatório, tais como IFN- γ , IL-1 α - β , CXCL9, CCL17, M-CSF, Mieloperoxidase, IL-33, especialmente quando comparado com os cultivos em Normóxia (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Dentre as proteínas classificadas como pró-inflamatórias, somente o G-CSF encontra-se aumentada nos cultivos com IL-17/Normóxia em comparação com os cultivos em Hipóxia (** $p < 0,01$). O GM-CSF apresentou perfil semelhante ao G-CSF, porém sem diferença estatística. Dentre as proteínas classificadas como anti-inflamatórias, apenas GDF-15/MIC-1 mostrou-se ligeiramente aumentado no condicionamento com IL-17/Normóxia, especialmente em comparação com o MC dos cultivos em Hipóxia, porém sem diferença estatística. Entre as proteínas classificadas como outras, apenas o CD147 apresentou níveis aumentados nos MC das IL-17/Normóxia em comparação com os cultivos em Hipóxia (* $p < 0,05$).

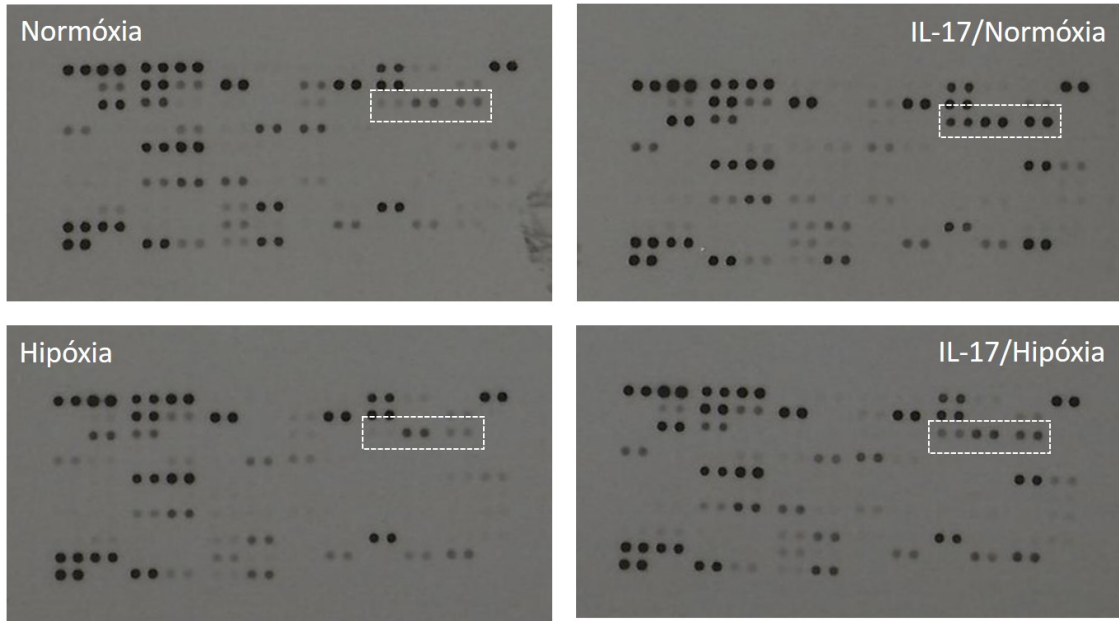
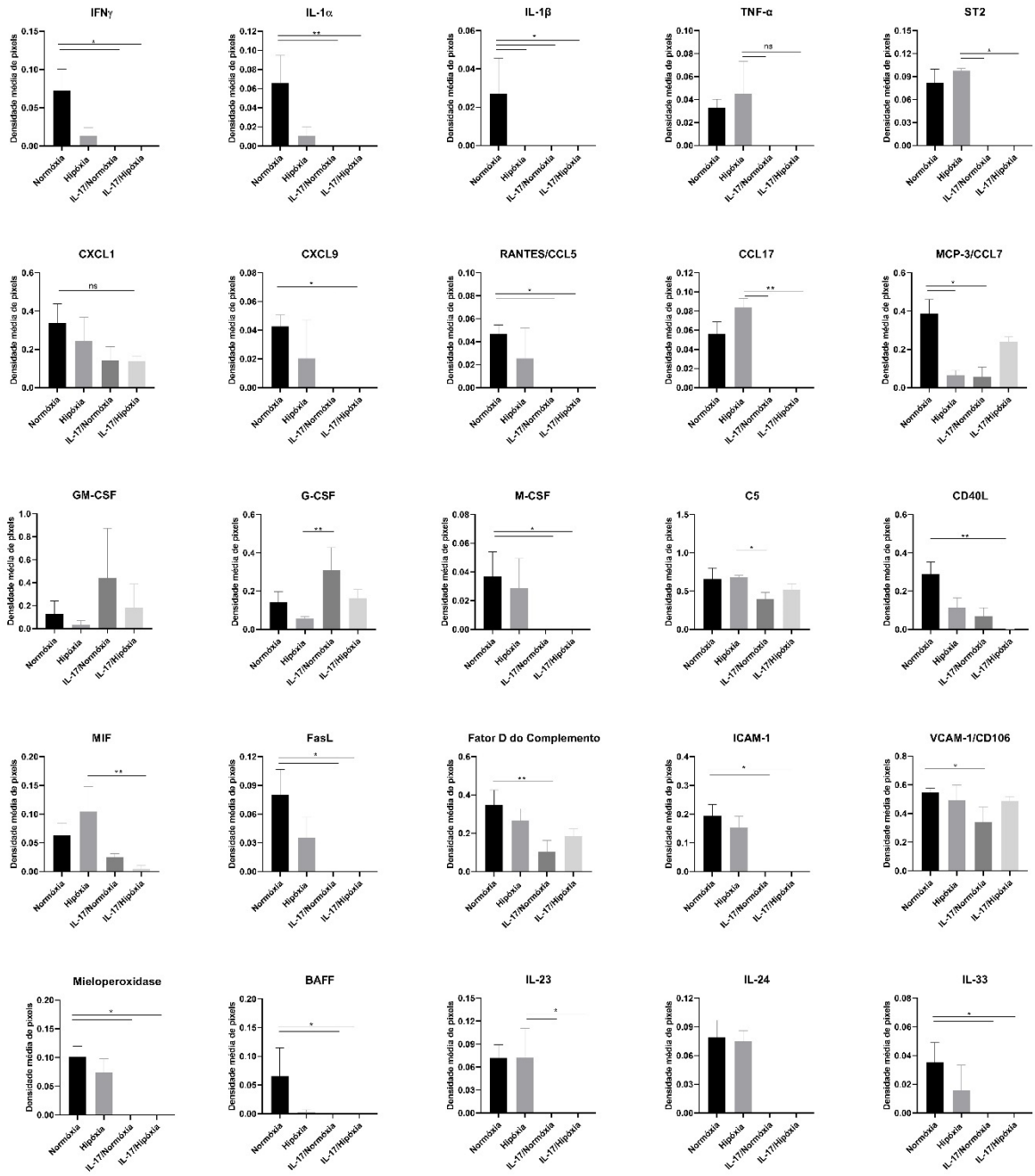


Figura 29. Perfil de citocinas no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normoxia ou hipoxia, pr -condicionadas ou não com IL-17. Imagens representativas do imunensaio de membrana (Human XL Cytokine Array Proteome Array, R&D Systems) demonstrando o perfil de secreção de fatores solúveis de UC-MSC de um mesmo cordão umbilical cultivadas em biorreator em normoxia ou hipoxia, pr -condicionadas com IL-17 ou não. Os retângulos tracejados indicam as áreas correspondentes a detecção de G-CSF, GDF-15 e GM-CSF.

A



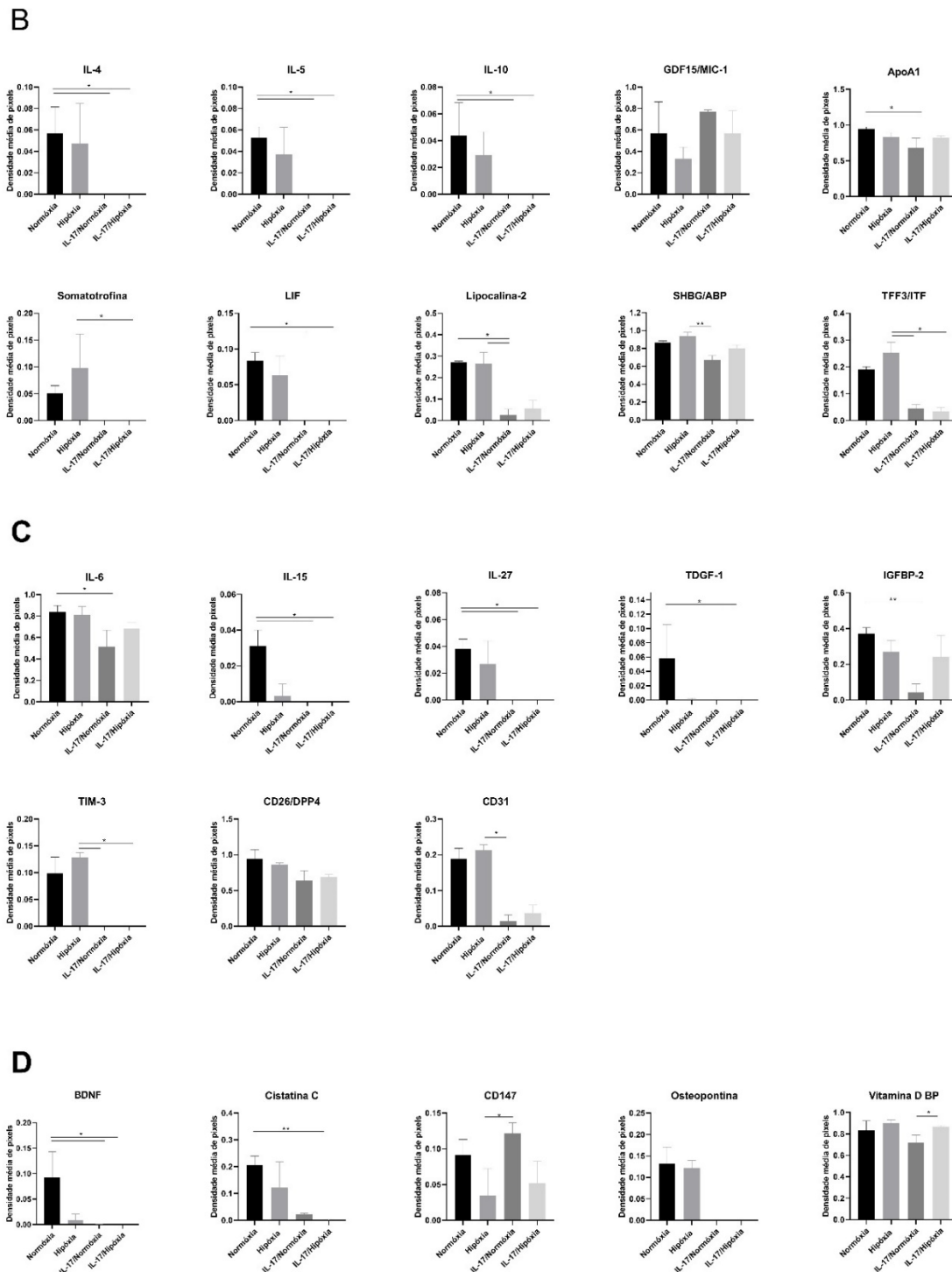


Figura 30. Perfil de citocinas no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. Foi utilizado um imunoenensaio de membrana (*Human Angiogenesis Proteome Array*, R&D Systems) e para quantificação de 55 proteínas no meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator de tanque agitado em condições de Normóxia ou Hipóxia, e pré-condicionadas com IL-17 ou não. As proteínas detectadas foram categorizadas como **(A)** pró-inflamatórias, **(B)** anti-inflamatórias, **(C)** pleiotrópicas e **(D)** outras. (n=2). As barras verticais correspondem a densidade média de pixels. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo (p>0,05), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

Com objetivo de validar uma “assinatura pró-angiogênica” ou “assinatura imunossupressora” de UC-MSC obtida de diferentes cordões umbilicais, os secretomas obtidos dos cultivos das UC-MSC em biorreator de tanque agitado foram utilizados para quantificação das moléculas imunossupressoras IDO, PGE-2 e TGF- β , e angiogênica, VEGF, pelo método de ELISA (Figura 31). Além disso, sobrenadante dos ensaios de co-cultivo das UC-MSC pré-condicionadas em biorreator com PBMC, para avaliação do potencial de inibição da proliferação de células T, também foi utilizado para quantificação desses biomarcadores.

Como apresentado na Figura 31A, observa-se uma tendência positiva na expressão de PGE-2 nos cultivos com IL-17/Hipóxia, especialmente em comparação com os cultivos em Hipóxia, porém sem diferença estatística. Enquanto IDO apresentou níveis significativamente aumentados no MC da condição IL-17/Hipóxia, em comparação com condição de Normóxia (* $p < 0,05$). Em contrapartida, os níveis de TGF- β foram muito similares, apresentando-se apenas ligeiramente reduzidos nos cultivos IL-17/Hipóxia, porém não significativo). Apesar de não apresentar diferença significativa, os níveis de VEGF apresentam tendência positiva nos cultivos em Hipóxia, IL-17/normóxia e IL-17/Hipóxia, em comparação com os cultivos em Normóxia.

A Figura 31B apresenta os resultados das quantificações de IDO, PGE-2, TGF- β e VEGF no sobrenadante dos ensaios de co-cultivo das UC-MSC cultivadas nas diferentes condições com PBMC. Não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativa entre as diferentes condições. No entanto, observou-se que o pré-condicionamento com IL-17 inibiu a secreção de PGE-2, enquanto que na condição IL-17/Hipóxia e Hipóxia, os níveis detectáveis de PGE-2 e semelhantes. O pré-condicionamento com Hipóxia somente favoreceu a secreção de IDO, comparado as outras condições. O pré-condicionamento combinado com IL-17/Hipóxia favoreceu a secreção de TGF- β , comparado às outras condições.

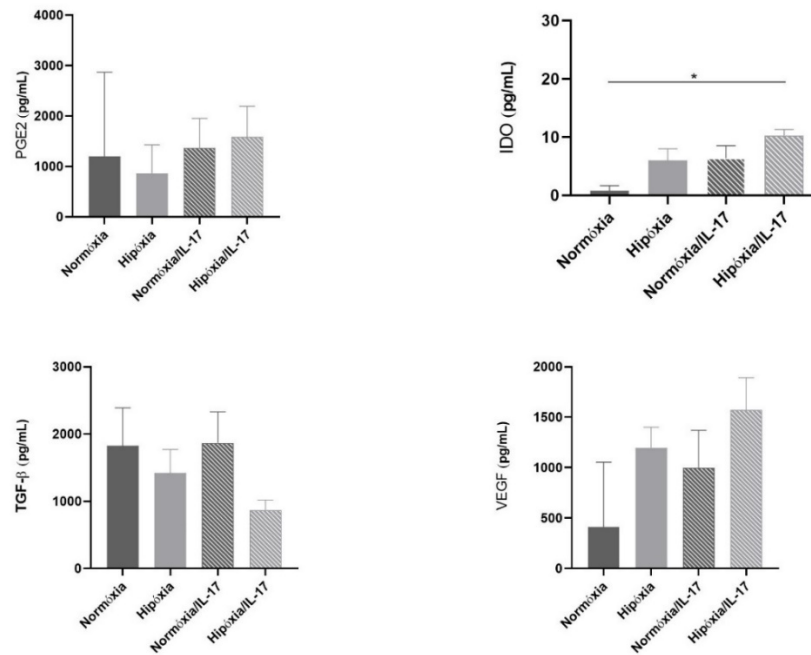
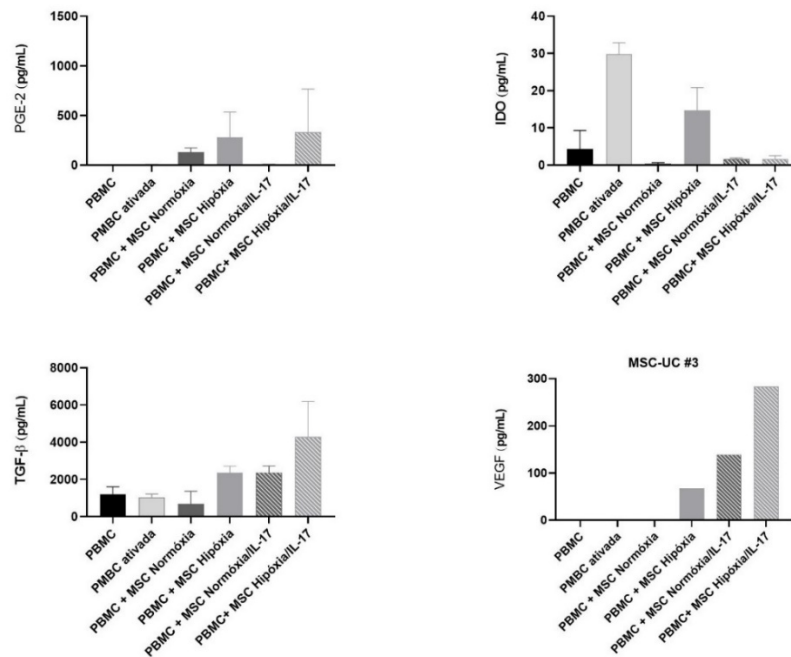
A**B**

Figura 31. Concentração de PGE-2, IDO, TGF-β e VEGF no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. O MC das UC-MSC cultivadas em biorreator (A) ou sobrenadante dos ensaios de co-cultivo com PBMC também foi analisado quanto a concentração das proteínas (B) (n=3). O Método foi analisado pelo método de ELISA, onde absorvância detectada por um leitor de microplacas é diretamente proporcional à concentração das proteínas. As barras verticais correspondem às médias das concentrações dos analitos e ao SEM das amostras. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. O teste estatístico Kruskal-Wallis (não-paramétrico) foi utilizado para comparar 3 ou mais grupos independentes. Quando o resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo (p>0,05), realizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn para comparações de 2 grupos.

5.2.6. Análise do processo autofágico de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.

Com objetivo de investigar se os diferentes pré-condicionamentos (cultivo 3D, hipóxia e ou IL-17) estariam induzindo ou inibindo o processo autofágico nas UC-MSc durante expansão em biorreator de tanque agitado, a expressão do marcador de autofagia LC3B foi avaliada por *Western Blotting*. O perfil de conversão de LC3B-I para LC3B-II é indicado pela razão LC3B-II/LC3B-I. O aumento de LC3B-II sugere processo autofágico, uma vez que LC3B-I é clivada e sofre processo de lipidação sendo convertida à LC3B-II que incorpora seletivamente na membrana do autofagossomo. Como apresentado na Figura 32, observa-se uma significativa variação da razão LC3B-II/LC3B-I entre as três amostras de UC-MSc e entre diferentes condições de cultivo para cada amostra de UC-MSc. As razões de LC3B-II/LC3B-I aparecem mais elevadas em UC-MSc pré-condicionadas com IL-17/Normóxia nas UC-MSc#2 e UC-MSc#3 em comparação às demais condições. Além disso, nas UC-MSc#2 e UC-MSc#3 a razão LC3B-II/LC3B-I foram menores quando cultivadas em Hipóxia, comparado às demais condições. No entanto, a amostra UC-MSc#1 apresentou um perfil autofágico diferente, especialmente para condição de Normóxia e IL-17/Normóxia, que apresentaram razão LC3B-II/LC3B-I bastante reduzidas (1,88 e 2,22, respectivamente) quando comparadas às mesmas condições das demais amostras de UC-MSc (Figura 32).

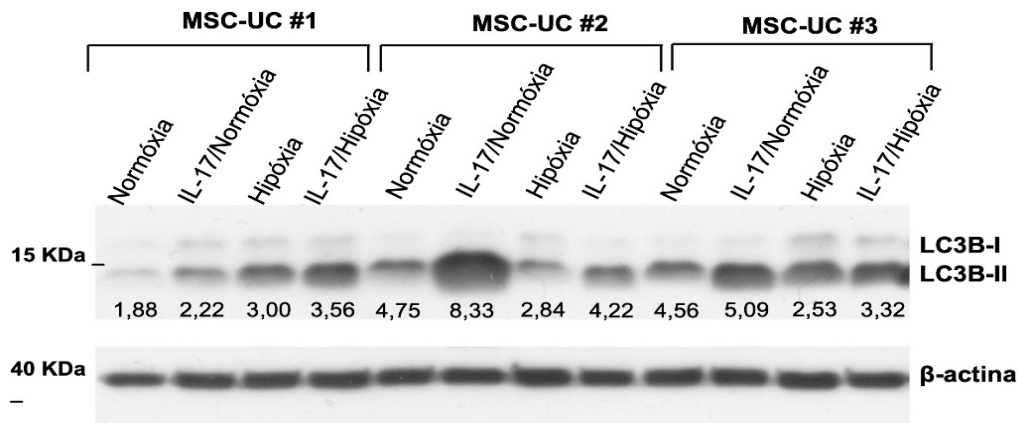


Figura 32. Análise do processo autofágico em UC-MSC cultivadas em biorreator em normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17. O processo autofágico para detecção do marcador de autofagia LC3B-II por Western blotting. A intensidade das bandas LC3B-I e LC3B-II foi mensurada e foi calculada a razão LC3B-II/LC3B-I.

6. DISCUSSÃO

Diversas abordagens de pré-condicionamento ou *priming* de MSC têm sido investigadas nos últimos anos a fim de melhorar o potencial terapêutico dessas células, seja por aumentar a sobrevivência dessas células pós-transplante, ou propriamente seu potencial imunossupressor, regenerativo, anti-apoptótico, angiogênico. Dentre as principais estratégias avaliadas, encontra-se o cultivo em hipóxia, que aumenta enxertia e sobrevivência em microambientes isquêmicos, aumenta a secreção de fatores solúveis e de vesículas extracelulares, além de melhorar o potencial angiogênico das MSC. Em contrapartida, o *priming* com citocinas inflamatórias apresenta efeitos diversos, de maneira geral, aumenta o potencial imunossupressor/ imunomodulador das MSC. No entanto, poucos trabalhos avaliaram os efeitos do pré-condicionamento com a citocina inflamatória IL-17. Por outro lado, o cultivo 3D, seja pela formação de esferoides ou pelo uso de microcarregadores/ microtransportadores em sistemas agitados, também considerado uma estratégia de *priming*, têm demonstrado aumentar tanto as propriedades imunomoduladoras quanto angiogênicas (Noronha *et al.*, 2019; Regmi *et al.*, 2019), além de aumentar a expressão de genes associados a pluripotência (Cheng *et al.*, 2013). Nesse trabalho, escolhemos como estratégias de *priming* o cultivo 3D em microcarregadores em sistema agitado em condições de normóxia ou hipóxia, combinadas ou não com IL-17. Além disso, foi escolhido um sistema de cultivo fechado, escalonável e livre de xenoantígenos para expansão e *priming* das MSC para futura aplicação no contexto clínico.

O cultivo extensivo a fim de alcançar números clinicamente relevantes de MSC em plataforma 2D resulta em alterações significativas no produto celular, diretamente relacionadas à diminuição do potencial terapêutico dessas células (senescência, alterações funcionais). Essas alterações refletem diretamente nos estudos clínicos com MSC, que têm demonstrado ao longo dos anos, em sua maioria, resultados insatisfatórios. A variabilidade inter-doador e entre células derivadas de diferentes fontes (de medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo), assim como diferentes protocolos de expansão, criopreservação e descongelamento, geram uma extensa variabilidade qualitativa dos lotes de células produzidos. Somado aos longos períodos de cultivo para produção de quantidades suficientes, o cultivo de células em 2D

apresenta diversas limitações, como a manipulação aberta e excessiva, alto risco de contaminação, falta de controle de parâmetros de produção e custo elevado.

Neste contexto, muitos trabalhos têm proposto plataformas tecnológicas alternativas para obtenção de grandes quantidades de células com qualidade terapêutica em conformidade com as normas de Boas Práticas de Manufatura (*GMP-Good Manufacturing Practices*) para ampla aplicação clínica. Nesse sentido, os biorreatores de tanque agitado consistem em um sistema de cultivo que permite monitoramento e controle adequados dos parâmetros durante cultivo (pH, temperatura, concentração de oxigênio e gás carbônico), além da manutenção de ambiente físico-químico homogêneo. Além disso, este sistema de biorreator apresenta fácil operação, mínima manipulação manual, considerável relação custo-benefício e permite implementação de um sistema fechado e de acordo com normas de agências regulatórias.

Neste estudo, estabelecemos um bioprocesso escalonável para expansão de UC-MSc de cultivo 3D em condições livres de xenoantígenos usando soro AB humano como suplemento e microcarregadores revestidos de colágeno humano para ancoramento das células. As UC-MSc foram cultivadas em condições de normóxia (20% O₂) ou hipóxia (5% O₂), na presença ou ausência da citocina inflamatória IL-17. A estratégia de pré-condicionamento/*priming* combinado com hipóxia e IL-17 foi proposta como tentativa de melhorar ao mesmo tempo as propriedades imunossupressoras e angiogênicas. As células cultivadas/ pré-condicionadas em biorreator foram caracterizadas fenotipicamente, e quanto ao seu potencial de diferenciação e imunossupressor em ensaio de co-cultivo. Foi avaliado seu potencial parácrino angiogênico sob células endoteliais, seu perfil de secreção de citocinas e fatores angiogênicos, e a influência dos diferentes condicionamentos sobre processo autofágico nessas células.

Assim como os resultados obtidos foram divididos em duas partes (I e II), a discussão também foi dividida em duas seções: Parte I. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em Hipóxia; Parte II. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em hipóxia e/ou IL-17.

Parte I. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em Hipóxia

Os resultados referentes à Parte I dos resultados foram publicados no artigo “*Hypoxia priming improves in vitro angiogenic properties of umbilical cord derived-mesenchymal stromal cells expanded in stirred-tank bioreactor*”, *Biochemical Engineering Journal* (Impact Factor: 3.9) DOI: 10.1016/j.bej.2021.107949 (vide artigo anexado à Tese).

Após padronização e estabelecimento de um protocolo com o uso do microcarregador SphereCol e suplementação com soro AB humano, foi possível expandir UC-MSC de maneira eficiente num curto período (5 dias de cultivo). Os resultados apresentados demonstram que o pré-condicionamento com hipóxia não afetou a capacidade proliferativa/fator de expansão das UC-MSC em sistema 3D agitado. Longos períodos de cultivo sem a adição de microcarregadores permitindo assim a transferência celular *bead-to-bead*, leva à formação de grandes agregados células/microcarregadores, o que diminui a eficiência de recuperação celular (Caruso *et al.*, 2014). A otimização do processo de expansão com aumento gradual da agitação durante o cultivo, evitando a sedimentação de células/microcarregadores, permitiu a formação de pequenos agregados em maioria, o que facilitou o processo de recuperação celular.

O perfil de expansão celular pode variar significativamente pelo uso de diferentes microcarregadores, pela concentração celular, tipo de fonte das MSC e pelos parâmetros físicos do sistema agitado refletindo na tensão de cisalhamento celular. No entanto, vários estudos demonstraram um fator de expansão semelhante ao que observamos em nosso trabalho no quinto dia de cultivo em sistemas agitados. Rafiq *et al.* relataram um aumento de 6 a 7 vezes do número de células no dia 9 de cultivo em biorreator de 5L usando o microcarregador não poroso P-102L com BM- MSC (Solohill Engineering Inc., EUA) (Rafiq *et al.*, 2013).

Por outro lado, Lawson e colaboradores (2017) relataram um fator de expansão superior usando um microcarregador revestido de colágeno porcino (Pall, Port Washington, NY) na concentração de 15g/L (concentração três vezes maior do que a utilizada no presente estudo), atingindo um aumento de 43 vezes no dia 11, porém com aumento de cerca de 13-14 vezes no quinto dia de cultivo (Lawson *et al.*, 2017). Já, Mikukami e colaboradores utilizando UC-MSC e o microcarregador Cultispher em uma concentração de 1g/L e observaram um fator de expansão de 7,5 ($\pm 1,2$) vezes

em 4 dias, a partir de um inóculo de $2,5 \times 10^4$ células/mL (Mizukami *et al.*, 2016). Ademais, uma expansão satisfatória de MSC derivadas de linhagem fetal humana foi obtida após 6 dias de cultivo com o microcarregador Cytodex 3 (8g/L) em 800 mL de volume de trabalho em biorreator de tanque agitado, atingindo um aumento de 16 vezes a partir da concentração inicial de 1×10^5 células/mL (Chen *et al.*, 2015).

O efeito do pré-condicionamento com hipóxia na proliferação e diferenciação de MSC é bastante controverso. Alguns estudos demonstraram aumento da capacidade proliferativa de MSC de diferentes fontes quando cultivadas sob hipóxia (1-5% O₂) (Lavrentieva *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2013). No entanto, Beegle e colaboradores demonstraram que a hipóxia inibiu a proliferação e diferenciação de BM-MS, proporcionalmente ao grau de hipóxia (Beegle *et al.*, 2015). Por outro lado, outros pesquisadores demonstraram um aumento significativo do potencial proliferativo de BM-MS condicionadas à hipóxia, e relataram que essas condições não influenciaram o potencial de diferenciação dessas células (Dos Santos *et al.*, 2010).

Heathman e colaboradores observaram um maior potencial de expansão de BM-MS cultivadas sob hipóxia, ao expandir essas células em um sistema de mini-biorreator (Heathman *et al.*, 2019). Curiosamente, segundo Lawson *et al.* o crescimento celular mostrou-se semelhante em condições de hipóxia e normóxia utilizando um sistema de biorreator e microcarregadores (Lawson *et al.*, 2017). Essas divergências podem estar associadas às diferentes condições testadas, como níveis de hipóxia e tempo de exposição, tipo de fonte das MSC e certamente à variabilidade intrínseca/genética das amostras de MSC provenientes de diferentes indivíduos.

É importante enfatizar que não há estudos anteriores demonstrando a expansão de MSC em sistemas agitados com o uso do microcarregador SphereCol (Advanced BioMatrix) (Tavassoli *et al.*, 2018; Derakhti *et al.*, 2019; Tsai and Pacak, 2021).

A recuperação celular após expansão em sistemas escalonáveis é um ponto chave para viabilizar efetivamente o bioprocesso. Os resultados obtidos demonstram que após expansão em biorreator, mesmo com a formação de pequenos agregados de células/microcarregadores, o tratamento enzimático com a enzima recombinante *Tryple* (isenta de xenoantígenos) permite a dissociação eficiente das UC-MS e microcarregadores, mantendo boa viabilidade celular. Usando a mesma abordagem utilizada neste estudo (filtração com *cell strainer* 100um), Caruso e colaboradores

(2014) relataram eficiência de *harvesting* de até 87,2% com uso do microcarregador Cytodex 3 (GE Healthcare, BioSciences, Suécia) em frascos *spinner* (Caruso *et al.*, 2014), enquanto Tozzeti e colaboradores (2017) alcançaram uma recuperação de 80% para frascos *spinner* e 46,6% para biorreator usando o microcarregador de plástico P102L (SoloHill, Logan, EUA) (Tozzetti *et al.*, 2017). Semelhante aos nossos resultados, (Mizukami *et al.*, 2018) relataram uma eficiência da recuperação celular de 61% ($\pm 15,7$).

A dissociação das células dos microcarregadores é dificultada pela formação de grandes aglomerados, que é dependente de vários fatores, em particular pelas características do microcarregador (porosidade, carga), a composição do meio de cultura e condições de cultura que influenciam a expressão de diferentes perfis de moléculas de adesão (Mizukami *et al.*, 2018). Assim, a obtenção de células individualizadas ao final do processo de dissociação enzimática é fundamental para uma maior recuperação celular.

Dessa forma, observamos que o revestimento de colágeno do microcarregador SphereCol viabilizou eficientemente a dissociação celular, permitindo a adoção de estratégias mais efetivas e escalonáveis para recuperação celular. Alguns estudos demonstraram diferentes abordagens de recuperação celular. Nienow e colaboradores mostraram uma estratégia eficiente para recuperação de MSC utilizando intensa agitação por curto período de tempo e sistema de filtração à vácuo permitindo uma recuperação celular superior a 95% (Nienow *et al.*, 2014; Nienow *et al.*, 2016). Outro trabalho demonstrou estratégias melhoradas de lavagem e concentração celular por filtração de fluxo tangencial (TFF), permitindo alta concentração e viabilidade celular, e recuperação superior a 80% (Cunha *et al.*, 2015). Moloudi e colaboradores (2018) desenvolveram uma estratégia escalonável de filtração usando um canal espiral trapezoidal de alto rendimento permitiu recuperação celular de cerca de 94% após duas etapas, com a viabilidade celular mantida em $93,16 \pm 2\%$ (Moloudi *et al.*, 2018). Desta forma, a recuperação celular após expansão das UC-MSc em sistema agitado com o microcarregador SphereCol pode ser consideravelmente melhorada no futuro com o uso de estratégias aprimoradas.

Em seguida, avaliamos o perfil metabólico das UC-MSc após a expansão em biorreator. As UC-MSc cultivadas em normóxia ou hipóxia apresentaram perfil semelhante, porém no dia 2 de cultivo, UC-MSc cultivadas em hipóxia apresentaram taxas mais elevadas de consumo de glicose. O rendimento aparente de lactato a partir

de glicose (Y lactato/glicose) também foi calculado, e reflete a variação encontrada no consumo de glicose e nas taxas de produção de lactato entre os cultivos em normóxia ou hipóxia, e provavelmente indica vias metabólicas distintas nas diferentes condições.

A alta variabilidade no rendimento de lactato a partir de glicose também demonstrou a variabilidade de adaptação metabólica entre as diferentes amostras de UC-MSC. Níveis baixos de oxigênio acionam a mudança bioenergética da glicólise combinada com fosforilação oxidativa para glicólise anaeróbica (Dos Santos *et al.*, 2010; Lavrentieva *et al.*, 2010; Heathman *et al.*, 2019; Salazar-Noratto *et al.*, 2020). De fato, o valor de Y lactato/glicose < 2 especificamente no segundo dia (Ylac / gluc = 1,44 ± 0,67) calculado para ensaios de hipóxia, corroborando com predominância de metabólitos glicolíticos sob baixos níveis de oxigênio disponível.

Dos Santos *et al.* (2010) também observaram valores consistentemente mais altos da taxa de consumo de glicose no início do cultivo (0 a 7 dias) de BM-MSC expandidas sob hipóxia quando comparados aos ensaios de normóxia (14-17 pmol.dia⁻¹.célula⁻¹ e 12-14 pmol.dia⁻¹. célula⁻¹, respectivamente), e os valores tornaram-se similares nos dias seguintes (Dos Santos *et al.*, 2010). Assim como resultados controversos a respeito do potencial de expansão, alguns estudos mostraram resultados controversos em relação ao metabolismo de MSC derivadas de diferentes fontes e indivíduos, quando cultivadas em diferentes níveis de saturação de oxigênio. Em geral, estudos anteriores mostraram aumento do consumo de glicose e produção de lactato em baixas concentrações de oxigênio (Dos Santos *et al.*, 2010; Lavrentieva *et al.*, 2010; Heathman *et al.*, 2019; Salazar-Noratto *et al.*, 2020).

A hipóxia também não afetou o imunofenótipo e o potencial de diferenciação das UC-MSC. A análise por imunofenotipagem também demonstrou alta expressão (> 90%) dos marcadores CD90, CD73, CD44, CD13, CD49e e CD29, com uma ligeira diminuição da expressão de CD105 e CD166 (porém sem diferença estatística). Achados semelhantes já foram descritos em estudos anteriores sobre sistemas de expansão em biorreatores devido ao processo de recuperação celular (Mizukami *et al.*, 2016; De Sousa Pinto *et al.*, 2019), uma vez que essas moléculas estão associadas à organização do citoesqueleto/migração e adesão, respectivamente. No entanto, os baixos níveis de expressão das moléculas CD105 e CD166 são apenas transitórios e podem ser restabelecidos quando essas células são re-cultivadas em

sistemas estáticos, sem afetar suas propriedades funcionais (Dos Santos *et al.*, 2014; Mizukami *et al.*, 2018).

O secretoma (ou meio condicionado, MC) dos cultivos em normóxia e hipóxia foram utilizados para avaliação do potencial parácrino sobre células endoteliais derivadas de veia de cordão umbilical (HUVEC). Os resultados demonstraram que a hipóxia aumenta o potencial parácrino angiogênico das UC-MSc sobre as HUVEC, evidenciado pela maior migração das mesmas e maior formação de tubos/estruturas capilares em ensaio de angiogênese em matrigel, quando comparado aos cultivos em normóxia.

Vários estudos realizados em cultura planar (2D) revelaram que as MSC pré-condicionadas em hipóxia apresentam maior potencial angiogênico quando comparadas àquelas cultivadas em condições de normóxia (Estrada *et al.*, 2012; Haque *et al.*, 2013; Bader *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017; Mathew *et al.*, 2017). A hipóxia aumenta a secreção de fatores solúveis, tais como HGF e FGF, e vesículas extracelulares, bem como de moléculas angiogênicas, especialmente o VEGF e a angiogenina, as quais estão associadas a um maior potencial pró-angiogênico e regenerativo das MSC pré-condicionadas (Collino *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2019).

O estudo de Kehl e colaboradores através da análise proteômica do secretoma de MSC isoladas de diferentes fontes, especificamente medula óssea (BM), tecido adiposo (AT) e geléia de Wharton (WJ), revelou que o secretoma de WJ-MSc exibe uma maior composição e concentração de proteínas angiogênicas (Kehl *et al.*, 2019). Mais recentemente, um estudo também demonstrou maior capacidade angiogênica *in vitro* de UC-MSc, comparado com MSC isoladas de tecido adiposo e medula óssea. Além disso, o potencial angiogênico foi aumentado quando essas células foram submetidas ao cultivo dinâmico em frascos *spinner* sob hipóxia (2% O₂), evidenciado por maior taxa de produção de fatores pró-angiogênicos, particularmente VEGF e HGF, além do meio condicionado desses cultivos apresentarem efeitos positivos sobre a taxa de migração e a capacidade de formação de tubos/estruturas com HUVEC (Pinto *et al.*, 2020). No entanto, Kang *et al.* demonstraram que MSC derivadas de sangue de cordão umbilical de diferentes doadoras respondem de forma diferente à hipóxia (1% de O₂ em condições estáticas), variando a expressão gênica de fatores relacionados à angiogênese nessas células, que consequentemente impactam no potencial terapêutico das MSC (Kang *et al.*, 2018).

Claramente, faltam estudos avaliando as propriedades funcionais de MSC após a expansão em sistemas de cultivo 3D e escalonáveis. Os resultados conflitantes ao longo de décadas de pesquisas evidenciam que as MSC de diferentes fontes apresentam disparidades em relação à expansão, potencial angiogênico, imunossupressor e regenerativo (Chinnadurai *et al.*, 2018; O'connor, 2019; Galipeau *et al.*, 2021). Essas diferenças devem ser consideradas para a seleção da fonte e doador da MSC para uso clínico. Particularmente, as UC-MSC têm demonstrado propriedades angiogênicas mais acentuadas (Kehl *et al.*, 2019; O'connor, 2019; Pinto *et al.*, 2020) e, possivelmente, podem apresentar melhores resultados em condições clínicas que envolvam distúrbios isquêmicos, estimulando maior angiogênese acentuada (Pinto *et al.*, 2020).

Diante desse cenário, nós também avaliamos o potencial direto das UC-MSC na formação de estruturas capilares em matrigel, sozinhas ou em co-cultivo com HUVEC. No entanto, as várias condições utilizadas não permitiram a formação de estruturas, sugerindo menor potencial angiogênico em matrigel. Esses resultados estão de acordo com estudo prévio de Kehl *et al.*, que demonstraram menor potencial para formação de estruturas quando comparado as MSC isoladas de outras fontes, como medula óssea e tecido adiposo, apesar de maior expressão e secreção de fatores angiogênicos (Kehl *et al.*, 2019).

As UC-MSC expandidas/pré-condicionadas em biorreator também foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da proliferação de células T em ensaio de co-cultivo com PBMC. Nossos resultados demonstraram que UC-MSC cultivadas em normóxia e hipóxia em biorreator mantêm potencial imunossupressor.

Alguns trabalhos demonstraram maior potencial imunossupressor de MSC cultivadas em hipóxia (Zhilai *et al.*, 2016; Baldari *et al.*, 2017; Wobma *et al.*, 2018; Gornostaeva *et al.*, 2020). Após 48h de condicionamento com hipóxia (1% O₂), AT-MSC demonstraram maior potencial de inibição de proliferação e ativação de células T, em comparação às células cultivadas em normóxia, o que foi associado a regulação positiva de genes supressores (HLA-G e COX-2) (Wobma *et al.*, 2018). AT-MSC também apresentaram maior inibição da proliferação e ativação de células T, bem como inibiram mais eficientemente a produção de citocinas inflamatórias, e aumentaram significativamente a produção de citocinas anti-inflamatórias em ensaios de co-cultivo realizados em hipóxia (5% O₂).

Células T co-cultivadas com MSC pré-condicionadas em hipóxia também apresentaram regulação positiva de FOXP3, TGF- β 1 e PDCD1, envolvidos na regulação da resposta imune, e regulação negativa de genes envolvidos na resposta inflamatória, como IFN- γ e IL-2 (Gornostaeva *et al.*, 2020). Nossos resultados não demonstraram diferença no potencial de inibição da proliferação de linfócitos entre UC-MSC cultivadas em normóxia ou hipóxia. No entanto, o ensaio de co-cultivo foi realizado em incubadora padrão, em níveis de oxigênio ambientais, o que pode ter influenciado o potencial imunossupressor das células cultivadas em hipóxia, uma vez que possivelmente sofreram alterações metabólicas para se readaptarem às novas condições.

Parte II. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em hipóxia e/ou IL-17.

Na Parte II do estudo, foram avaliados os efeitos do pré-condicionamento com a citocina inflamatória IL-17 sob as UC-MSC em sistema de cultivo 3D agitado. Poucos estudos avaliaram o condicionamento com IL-17, sendo os resultados bastante controversos. Este foi primeiro estudo a avaliar os efeitos do pré-condicionamento com IL-17 em condições de normóxia ou hipóxia e nas UC-MSC em sistema de cultivo 3D com agitação.

Alguns trabalhos descreveram que o *priming* com a IL-17 provocou maior proliferação de MSC derivadas de medula óssea humana e de camundongos de maneira dose-dependente (Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Mojsilovic *et al.*, 2011; Sivanathan *et al.*, 2015). No entanto, com UC-MSC e em cultivo em condições agitadas não observamos esse efeito. Poucos trabalhos investigaram o efeito do condicionamento com a IL-17 em MSC, e os resultados são discrepantes, em decorrência das fontes utilizadas, concentração e tempo de tratamento com a citocina.

As UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 em condições de normóxia ou hipóxia mantiveram o potencial de diferenciação e imunofenótipo característicos. O pré-condicionamento com IL-17 em sistema 3D agitado não induziu a expressão de HLA-DR nessas células. Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios que não observaram aumento a expressão de HLA-DR após pré-condicionamento de MSC com IL-17 (Mojsilovic *et al.*, 2015; Sivanathan *et al.*, 2015; Du-Rocher *et al.*, 2020). Poucos estudos que avaliaram a influência do *priming* com IL-17 no potencial

de diferenciação de MSC e os resultados são conflitantes, porém, de maneira geral, a o tratamento com a citocina parece potencializar a diferenciação osteogênica. Em nossos ensaios realizados com UC-MSC expandidas em sistema 3D agitado, não observamos diferença no potencial de diferenciação pelo pré-condicionamento com IL-17. O priming das UC-MSC com IL-17 não inibiu a diferenciação adipogênica e condrogênica, assim como não aumentou a diferenciação osteogênica. No entanto, reconhecemos que os ensaios de diferenciação utilizados neste estudo são qualitativos, e que ensaios mais refinados como a expressão de genes associados à diferenciação, podem contribuir para melhor entendimento da influência do *priming* nas propriedades das UC-MSC.

As análises de metabolismo revelaram taxas de consumo de glicose semelhantes para as duas condições (IL-17 em normóxia ou hipóxia), ligeiramente inferiores quando comparadas ao cultivo sem a citocina nos dois primeiros dias de cultivo. No entanto, não houve diferença estatística.

Avaliamos também se o meio condicionado (MC)/secretoma das UC-MSC condicionadas em biorreator influencia na migração/mobilização de células endoteliais (HUVEC). Os resultados demonstraram que o MC das UC-MSC do pré-condicionadas com IL-17 em normóxia inibiu significativamente o potencial de migração de HUVEC quando comparado ao MC dos cultivos em hipóxia. O MC IL-17/Normóxia também apresentou reduzido potencial de formação de estruturas/tubos capilares a partir de HUVEC, no ensaio de angiogênese em matrigel. Corroborando estes resultados, as análises de proteoma demonstraram que o *priming* com IL-17 inibiu consistentemente a secreção de vários fatores relacionados à angiogênese.

No entanto, o VEGF, mais intensamente secretado pelas UC-MSC pré-condicionadas em hipóxia, foi secretado em níveis semelhantes nos cultivos em IL-17/normóxia e IL-17/hipóxia. O reduzido efeito sobre as HUVEC sugere a participação de mecanismos/moléculas adicionais.

Em geral, UC-MSC condicionadas com IL-17 exibem perfil de secreção de vários fatores pró- e anti-angiogênicos em níveis consistentemente mais baixos em relação aos controles (UC-MSC cultivadas em normóxia), e os ensaios com HUVEC demonstraram reduzido potencial angiogênico.

Vale ressaltar que o secretoma das UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 apresentou níveis ligeiramente aumentados de angiostatina, um inibidor de angiogênese. Um estudo recente avaliou o potencial da angiostatina na inibição da

angiogênese e promoção da condrogênese em *scaffolds* de colágeno com MSC implantados subcutaneamente em ratos. A angiostatina diminuiu a expressão de genes angiogênicos nos *scaffolds* com MSC (Helgeland *et al.*, 2020).

As análises de perfil de secreção de citocinas demonstraram que o condicionamento com IL-17, em condição de normóxia ou hipóxia, também inibiu consistentemente a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, quando em comparação com os controles. Curiosamente, as análises de *proteome array* demonstraram níveis significativamente mais elevados de CD147 no secretoma de UC-MSC condicionadas com IL-17/Normóxia em comparação com células cultivadas em hipóxia somente. Embora sem diferença estatística, os cultivos em normóxia apresentaram níveis ligeiramente mais elevados também comparado aos cultivos em hipóxia, e o *priming* com a citocina IL-17 potencializou a secreção dessa proteína.

A molécula CD147 (Basigina/ Emmprin) é uma glicoproteína transmembrana, membro da superfamília das imunoglobulinas, que tem papel no reconhecimento e adesão inter-celular e é um potente indutor de metaloproteinases de matriz (MMPs) e citocinas. A basigina é amplamente expresso a diferentes níveis por células estromais, epiteliais, fibroblastos, células cancerosas e imunes, e contêm um domínio transmembrana altamente conservado que medeia interações com outras proteínas transmembranas, estando envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos (Xiong *et al.*, 2014). Têm papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral, justamente por induzir a alta expressão de MMPs e fatores angiogênicos, como o VEGF, por aumentar a fosforilação de PI3K/Akt e MAPK (Dai *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Além disso, a basigina funciona como um fator adjuvante para transportadores de monocarboxilato (MCTs), que permitem o metabolismo altamente glicolítico das células tumorais, pelo transporte do excesso de lactato das células tumorais, que por sua vez é prejudicial às células vizinhas, especialmente do infiltrado de células imunes que tentam combater as células tumorais (Le Floch *et al.*, 2011).

Mais recentemente, Li *et al* (2020), demonstraram que a regulação positiva de basigina em hepatocarcinoma celular está correlacionada com aumento de GLUT1, e que a basigina promove o metabolismo glicolítico através de PI3K/Akt/mTOR (Li *et al.*, 2020). O aumento da expressão de CD147/basigina em células tumorais também é induzido via fatores de transcrição relacionados à hipóxia, como HIF-1 e Sp1, que se liga à um elemento específico de resposta à hipóxia na região promotora do gene que codifica a basigina (Ke *et al.*, 2012). No entanto, o cultivo das UC-MSC com IL-17 em

hipóxia não aumentou a secreção dessa proteína, sugerindo que outras vias de sinalização ou metabólicas estão envolvidas.

Ademais, a glicoproteína CD147/ basigina tem um papel importante na maturação tímica de células T, além de ser constitutivamente expressa por subpopulações de células T circulantes nas quais funciona como receptor de ciclofilinas. A sinalização via CD147/ciclofilinas desencadeia quimiotaxia e adesão celular (Landskron and Taskén, 2013). A glicoproteína CD147/basigina é também um marcador de células T reguladoras (Treg) ativadas e está relacionada à sua função supressora (Solstad *et al.*, 2011; Landskron and Taskén, 2013). Estudos têm correlacionado a alta expressão de CD147 com potencial supressor elevado de Tregs.

Guo *et al.* descreveram significativa diminuição da razão CD147^{hi} /CD147^{low} em células T CD4⁺CD25⁺ e deficiência funcional de Treg em pacientes com espondilite anquilosante ativa, apesar da presença de números normais de Treg nestes pacientes comparados com indivíduos saudáveis (Guo *et al.*, 2018). Além disso, a prevalência da expressão de FOXP3 em células TCD4⁺ foi positivamente correlacionada com a expressão de CD147 em tecidos tumorais de hepatocarcinoma celular (Li *et al.*, 2020). Os autores observaram um aumento de Treg FOXP3⁺ em ensaios de co-cultivo de células TCD4⁺ com células de hepatocarcinoma celular que foram geneticamente modificadas para superexpressar a CD147/basigina. A adição de um inibidor de glicólise diminuiu significativamente a expressão de FOXP3 nestes co-cultivos (Li *et al.*, 2020).

Além disso, Chen e colaboradores (2021) demonstraram que células epiteliais tímicas (TEC) funcionais em camundongos CD147 *knockout* apresentam uma desaceleração do processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), demonstrando que CD147 está envolvido também com a involução tímica e redução da imunidade relacionada à idade (Chen *et al.*, 2021). Sivanathan *et al.* (2015) demonstraram que MSC pré-condicionadas com IL-17 induzem geração de células Treg e correlacionaram este efeito com aumento da expressão de IL-6 (Sivanathan *et al.*, 2015). No entanto, outras moléculas podem estar envolvidas neste processo. Dessa forma, sugerimos que a secreção elevada de CD147 por UC-MSc pré-condicionadas com IL-17 e seu conhecido papel na função de células Treg possa ser um novo mecanismo de indução da diferenciação/maturação funcional de células T supressoras.

Mais recentemente, a glicoproteína CD147/basigina foi descrita como um possível co-receptor usado pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 para invadir células hospedeiras, o que levou a vários estudos clínicos buscando estratégias de bloqueio de CD147 a fim diminuir a infecção (Radzikowska *et al.*, 2020; Ulrich and Pillat, 2020). No entanto, os resultados desses estudos em COVID-19 ainda são controversos. Geng *et al.* (2021) demonstraram que o tratamento com anti-CD147 efetivamente inibiu a infecção e a tempestade de citocinas provocada pelas diversas variantes do novo coronavírus (Geng *et al.*, 2021). No entanto, o envolvimento de CD147 na infecção por SARS-CoV-2 ainda está sobre debate (Fenzia *et al.*, 2021). Ragotte e colaboradores relataram que a glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 não interage diretamente com CD147 (Ragotte *et al.*, 2021).

Diversos trabalhos têm associado o potencial terapêutico de MSC com o processo de autofagia, seja pela indução ou inibição deste processo nas MSC, ou pelo potencial dessas células em influenciar o processo autofágico em outras células/tecidos (Gao *et al.*, 2016; Lee and Joe, 2018; Cen *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Assim, para entendermos se os diferentes pré-condicionamentos avaliados neste trabalho estariam influenciando o processo autofágico nas UC-MSC, nós avaliamos a expressão protéica de LC3, que é um marcador de autofagia.

A autofagia é um processo altamente conservado em células eucarióticas caracterizado pela degradação de proteínas, organelas e outros componentes citosólicos em estruturas denominadas autofagolisossomos, nos quais os produtos de degradação são reutilizados na biossíntese de novas proteínas/estruturas (Shibutani *et al.*, 2015; Khandia *et al.*, 2019). Este processo ocorre fisiologicamente em níveis basais e pode ser induzido por flutuações metabólicas e (micro)ambientais às quais as células são expostas, tais como privação de nutrientes, alterações de pH, estresse metabólico, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, variações de temperatura, sinalização por citocinas e/ou hormônios e em condição de hipóxia (Petibone *et al.*, 2017; Riffelmacher *et al.*, 2018; Khandia *et al.*, 2019). Dessa forma, a autofagia pode ser entendida como um processo de adaptação e defesa das células em condições não homeostáticas, a fim de restabelecer a homeostasia bioenergética (Khandia *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020).

Durante o processo autofágico ocorre a formação de uma vesícula de membrana dupla (autofagossomo) que pode derivar-se de diversas organelas, como

retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias ou da própria membrana citoplasmática (Rubinsztein *et al.*, 2012; Shibutani *et al.*, 2015). Após a formação do autofagossomo ocorre a fusão dessa estrutura com a membrana lisossomal, seguida pela degradação da carga autofágica. Vários complexos proteicos atuam na formação e maturação dessas vesículas autofágicas. Durante a ativação autofágica, ocorre a clivagem da proteína precursora chamada LC3, formando LC3B-I citosólica que é clivada e sofre uma lipidação com fosfatidiletanolamina (PE), processo que envolve também as proteínas Atg7, Atg3 e o complexo ATG12-ATG5-ATG16L1, formando a LC3B-II (Nakatogawa, 2020). Por conseguinte, a LC3-II é fortemente associada à membrana autofagossômica e serve como um marcador típico do autofagossomo completo/maduro. Dessa forma, a presença de LC3-II indica que o processo autofágico está ativado nas células (Kawabata and Yoshimori, 2020; Nakatogawa, 2020).

Neste presente trabalho, avaliamos a expressão das proteínas LC3BI e LC3BII nas UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado nas diferentes condições de pré-condicionamento. Quanto maior a razão LC3BII/LC3BI significa que o processo autofágico está mais estimulado naquela célula.

O perfil de expressão de LC3-I e LC3B-II nas UC-MSc expandidas em sistema 3D agitado revelou particularidades intrínsecas das diferentes amostras de UC-MSc em resposta aos diferentes pré-condicionamentos. Sabe-se que o *priming* com hipóxia induz positivamente o processo autofágico em MSC (Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020). No entanto, apenas a UC-MSc#1 apresentou esse perfil, apresentando uma razão LC3BII/LC3BI de 3 *versus* 1,88 para as células cultivadas em hipóxia e normóxia, respectivamente; enquanto que as UC-MSc pré-condicionadas com IL-17 apresentaram razão LC3BII/LC3BI de 2,22 e 3,56 nos cultivos em normóxia e hipóxia, respectivamente. Estes resultados indicam que a IL-17 potencializa o processo autofágico nas UC-MSc#1 nas duas condições de saturação de oxigênio.

No entanto, as UC-MSc#2 e UC-MSc#3 apresentaram um perfil autofágico diferente. As UC-MSc#2 e UC-MSc#3 cultivadas em normóxia apresentaram maiores razões LC3B-II/LC3B-I que os cultivos em hipóxia (4,75 e 4,56 para normóxia, e 2,54 e 2,83 para hipóxia, respectivamente). No entanto, assim como ocorreu para a UC-MSc#1, o pré-condicionamento com IL-17 induziu maiores níveis de autofagia nas duas condições de saturação de oxigênio.

Os resultados sugerem que apenas o cultivo das UC-MSC em sistema 3D agitado em normóxia modula diferencialmente o processo autofágico em UC-MSC isoladas de diferentes cordões umbilicais. Ademais, as UC-MSC parecem responder diferencialmente ao pré-condicionamento com hipóxia e/ou IL-17.

Regmi *et al.* (2020) demonstraram recentemente que o cultivo de MSC em sistema 3D aumenta os níveis de autofagia, e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, quando comparado ao cultivo das células em 2D. Já, a inibição da autofagia aumentou os níveis de apoptose (Regmi *et al.*, 2019). Nesse trabalho, os autores mostraram que MSC cultivadas em 3D apresentaram a regulação positiva de hemeoxigenase-1 (HO-1), molécula imunorreguladora, sendo que a inibição de HIF-1 casou a supressão da expressão de HO-1 nessas células. Esses resultados sugerem que o eixo HO-1/HIF-1 desempenham um papel na modulação da autofagia em MSC em cultivo 3D (Regmi *et al.*, 2019). Um possível mecanismo a ser explorado nas UC-MSC cultivadas em sistema 3D em biorreator de tanque agitado, tanto em hipóxia na presença ou não de IL-17 que apresentaram níveis elevados de autofagia.

Embora não tenha sido possível detectar diferenças estatísticas quanto às propriedades imunossupressoras das UC-MSC nos ensaios de co-cultivo, foi notável que as células pré-condicionadas com IL-17/Hipóxia apresentaram potencial de inibição da proliferação de linfócitos ligeiramente superior às demais condições nas razões avaliadas, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (provavelmente devido ao número pequeno de UC-MSC avaliadas).

AIDO é um dos principais mecanismos imunossupressores de MSC (Ankrum *et al.*, 2014; Najjar *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018). Após estímulos inflamatórios, MSC expressam grandes quantidades deIDO que através do metabolismo de triptofano do microambiente pela via kinurenina, que consegue inibir a proliferação de células inflamatórias, seja pela degradação deste aminoácido essencial ou através de metabólitos citotóxicos formados (Meisel *et al.*, 2004; Munn and Mellor, 2013; Chinnadurai *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2018; Burnham *et al.*, 2020). Os pré-condicionamentos das UC-MSC em hipóxia, IL-17/normóxia e IL-17/hipóxia potencializaram a secreção deIDO, quando comparado à condição de cultivo em normóxia. No entanto, somente o MC das UC-MSC pré-condicionadas com IL-17/Hipóxia apresentou nível significativamente aumentado deIDO em comparação com o MC das células cultivadas em normóxia. Curiosamente, o sobrenadante do co-cultivos das UC-MSC cultivadas IL-17/Hipóxia apresentaram níveis reduzidos deIDO

e níveis ligeiramente superiores de TGF- β em comparação às outras condições, o que demonstra a existência de vias/mecanismos alternativas(os) de imunossupressão.

Gao e colaboradores (2016) demonstraram que níveis aumentados de autofagia correlacionam com maior potencial imunossupressor das MSC *in vitro* (Gao *et al.*, 2016). Como já foi demonstrado na literatura, o pré-condicionamento com hipóxia melhora o potencial imunossupressor/anti-inflamatório de MSC *in vivo* em modelos pré-clínicos (Rosova *et al.*, 2008; Leroux *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2015; Zhilai *et al.*, 2016). Dessa forma, ensaios mais refinados são necessários para identificar os mecanismos celulares e moleculares estimulados pelos diferentes pré-condicionamentos que promovem ou inibem o potencial imunossupressor das UC-MSC.

Vale ressaltar que nossos resultados falharam em apresentar resultados estatisticamente significativos. Os experimentos com biorreator e outros sistemas escalonáveis são limitados quanto ao número de replicatas biológicas e experimentais devido ao alto custo e complexidade. Além disso, observamos uma variação importante entre diferentes doadores em resposta aos diferentes pré-condicionamentos, tanto nos ensaios funcionais, quanto no perfil de secreção de citocinas/fatores, ainda mais evidentes na análise do processo autofágico. Identificamos, claramente, entre as 3 diferentes amostras de UC-MSC avaliadas, que a UC-MSC#2 apresenta potencial imunossupressor mais acentuado que as demais, assim como identificamos maior potencial angiogênico da UC-MSC#3. A dosagem de VEGF pelo método de ELISA no sobrenadante dos ensaios de co-cultivo, detectaram altos níveis do fator nos co-cultivos com UC-MSC#3, enquanto nos co-cultivos das demais, os níveis foram indetectáveis. Esses resultados sugerem fortemente que as estratégias de pré-condicionamento escolhidas não foram necessariamente suficientes para diminuir as variabilidades intrínsecas das UC-MSC, e que ensaios de potência precisam ser padronizados (pelo estabelecimento de controles e *cut-offs*) e utilizados para caracterização da “assinatura funcional” de cada UC-MSC para produção de lotes para uso clínico. Nesse contexto salientamos que diferentes amostras de UC-MSC podem apresentar vantagens específicas para diferentes aplicações clínicas onde tem-se maior necessidade de imunomodulação (como doenças inflamatórias ou imuno-mediadas) ou de regeneração tecidual/angiogênese (isquemia, úlceras de pele, infarto do miocárdio).

Com base em nossos resultados, sugerimos que cada amostra de UC-MSc, isolada de um cordão umbilical, seja caracterizada na segunda ou terceira passagem quanto à sua “assinatura funcional” que deve contemplar: ensaio funcional de potencial imunossupressor, ensaio funcional do potencial angiogênico e quantificação de PGE2 e VEGF (estabelecer *cut-offs*) no secretoma (meio condicionado) de 5 dias de cultivo.

7. RESUMO DOS RESULTADOS

1. UC-MSC expandem eficientemente por cinco dias em sistema de cultivo 3D agitado em condições de normóxia ou hipóxia, na presença ou ausência de IL-17, usando microcarregadores revestido de colágeno humano (*SphereCol*) e soro AB humano. Não houve diferença estatística entre as diferentes condições em relação à capacidade de proliferação e fator de expansão das UC-MSC.
2. Os protocolos de pré-condicionamento com condição de hipóxia e/ou com IL-17 em sistema 3D agitado foram estabelecidos com sucesso, ou seja, nestas condições padronizadas as UC-MSC apresentam intensa capacidade de proliferação, manutenção da viabilidade celular, além de boa recuperação celular ao final do cultivo.
3. UC-MSC expandidas em condição de hipóxia e/ou com IL-17 mantiveram o imunofenótipo, metabolismo e potencial de diferenciação característicos de MSC, quando comparados com as condições controles (UC-MSC expandidas em cultivo 3D ou 2D em normóxia).
4. Os pré-condicionamentos das UC-MSC com hipóxia ou com IL-17 não alteraram a capacidade imunossupressora das células no ensaio funcional *in vitro* de inibição da proliferação de linfócitos. Embora UC-MSC pré-condicionadas com hipóxia e IL-17 (*priming* combinado) tenham apresentado maior capacidade imunossupressora *in vitro* (nas razões 1:2 e 1:5 de MSC:PBMC) comparado às outras condições, as diferenças não foram estatisticamente significativas. O pré-condicionamento das UC-MSC com IL-17 em condição de normóxia aumentou significativamente a secreção de CD147, molécula com funções imunomoduladoras. Os pré-condicionamentos das UC-MSC em hipóxia, IL-17/normóxia, ou IL-17/hipóxia potencializaram a secreção da molécula imunossupressora IDO, quando comparado à condição de cultivo em normóxia. Os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos biológicos não foram ainda elucidados.
5. UC-MSC cultivadas em sistema 3D agitado e pré-condicionadas com hipóxia apresentaram maior potencial angiogênico *in vitro*, evidenciado pelo aumento da migração de células endoteliais da veia de cordão umbilical nos ensaios de *scratch*/migração celular e pela formação de estruturas semelhantes a capilares por

células endoteliais nos ensaios de angiogênese realizados. Já, o pré-condicionamento com IL-17/normóxia diminuiu significativamente o potencial angiogênico das UC-MSC *in vitro*, comparado às outras condições.

6. O pré-condicionamento de UC-MSC com hipóxia e/ou com IL-17 alterou o processo autofágico das células. Em geral, os pré-condicionamentos com IL-17 e/ou hipóxia aumentaram o processo autofágico, principalmente em duas das três amostras de UC-MSC avaliadas, evidenciado pelo aumento a razão entre as proteínas LC3B-II/L3B-I. No entanto, houve grande variação da modulação do processo autofágico entre as amostras avaliadas.
7. O secretoma das UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D agitado e pré-condicionadas em condições de hipóxia apresentou grande número de proteínas pró-angiogênicas, anti-angiogênicas, citocinas pró-inflamatórias e pró-inflamatórias, fatores de crescimento, dentre outras. Por outro lado, o secretoma das UC-MSC expandidas da mesma forma, porém pré-condicionadas com IL-17/normóxia e IL-17/hipóxia apresentou uma drástica diminuição do número e/ou concentração de proteínas bioativas. Além disso, as UC-MSC pré-condicionadas ou não com hipóxia e/ou IL-17, apresentaram paralelamente “assinatura angiogênica” pela secreção de VEGF e TGF- β e “assinatura imunossupressora” pela secreção de PGE2 e IDO, evidenciadas também pelos ensaios funcionais de angiogênese e inibição da proliferação de linfócitos, respectivamente.
8. Os resultados revelaram um possível mecanismo imunossupressor, via CD147, que foi estimulado pelo pré-condicionamento das UC-MSC com IL-17 em condição de normóxia.
9. O estabelecimento deste bioprocesso escalonável para expansão de UC-MSC pré-condicionadas com hipóxia, em condições livres de xenoantígenos, que apresentam maior potencial angiogênico, foi de extrema relevância para ampliação da terapia com UC-MSC no Brasil.

8. CONCLUSÃO

Neste estudo estabelecemos um novo protocolo de expansão de UC-MSc em sistema de cultivo 3D em biorreator de tanque agitado, escalonável e livre de xenoantígenos, durante o qual as células podem ser pré-condicionadas com hipóxia, citocinas, fatores de crescimento, fármacos, dentre outros. Nossa hipótese de que as UC-MSc expandidas e pré-condicionadas com hipóxia e/ou IL-17 em cultivo 3D apresentariam maior potencial imunossupressor e/ou angiogênico *in vitro* do que células sem pré-condicionamento, foi parcialmente confirmada.

Mostramos que o pré-condicionamento das UC-MSc com cultivo 3D e hipóxia aumentou significativamente o potencial angiogênico parácrino *in vitro* das células, o que foi associado ao aumento da secreção de VEGF. O pré-condicionamento com IL-17/normóxia diminuiu significativamente o potencial angiogênico das UC-MSc *in vitro*, comparado às outras condições. No entanto, resultados revelaram um possível mecanismo imunossupressor via CD147, ainda não descrito, que foi estimulado pelo pré-condicionamento das UC-MSc com IL-17/normóxia.

\

9. PUBLICAÇÕES RELACIONADAS A TESE DE DOUTORADO

Foram publicados dois artigos durante doutoramento, uma revisão de literatura e um artigo original com parte dos resultados obtidos:

Noronha, Nádia C.; Mizukami, Amanda; Caliari-Oliveira, Carolina; Cominal, Juçara G.; Rocha, José Lucas M.; Covas, Dimas T.; Swiech, Kamilla; Malmegrim, Kelen C.R. *Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies*. Stem Cell Research and Therapy, 2019, 10(1), 131; doi: **10.1186/s13287-019-1224-y**; Fator de impacto: 6,83; Citações Scopus: 133 em 24/10/21.

Noronha, Nádia C., Mizukami, Amanda, Orellana, Maristela D., Oliveira, Maria C., Covas, Dimas T., Swiech, Kamilla, Malmegrim, Kelen C.R. *Hypoxia priming improves in vitro angiogenic properties of umbilical cord derived-mesenchymal stromal cells expanded in stirred-tank bioreactor*. Biochemical Engineering Journal 168 (2021) 107949; doi: **10.1016/j.bej.2021.107949**; Fator de impacto: 3,97; Citações Scopus: 1 em 24/10/21.

10. REFERÊNCIAS

ALCAYAGA-MIRANDA, F.; CUENCA, J.; KHOURY, M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. **Front Immunol**, v. 8, p. 339, 2017. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424688> >.

ALGERI, M. et al. Mesenchymal stromal cells and chronic inflammatory bowel disease. **Immunol Lett**, v. 168, n. 2, p. 191-200, Dec 2015. ISSN 0165-2478.

AMABLE, P. R. et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 2, p. 53, Apr 2014. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739658> >.

ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 3, p. 252-60, Mar 2014. ISSN 1087-0156.

ANTHONY, B. A.; LINK, D. C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. **Trends Immunol**, v. 35, n. 1, p. 32-7, Jan 2014. ISSN 1471-4906.

BADER, A. M. et al. Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138477, 2015. ISSN 1932-6203.

BALDARI, S. et al. Challenges and Strategies for Improving the Regenerative Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 10, Oct 2 2017. ISSN 1422-0067.

BANERJEE, A. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells modulate dextran sulfate sodium induced acute colitis in immunodeficient mice. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 79, Apr 16 2015. ISSN 1757-6512.

BEEGLE, J. et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. **Stem Cells**, v. 33, n. 6, p. 1818-28, Jun 2015. ISSN 1066-5099.

BERNARDO, MARIA E.; FIBBE, WILLEM E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 392-402, 2013/10/03/ 2013. ISSN 1934-5909. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590913004062> >.

BETOUS, R. et al. Human Adipose-Derived Stem Cells Expanded Under Ambient Oxygen Concentration Accumulate Oxidative DNA Lesions and Experience Procarcinogenic DNA Replication Stress. **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 1, p. 68-76, Jan 2017. ISSN 2157-6564 (Print) 2157-6564.

BOTTCHER, M. et al. Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation. **Stem Cells**, v. 34, n. 2, p. 516-21, Feb 2016. ISSN 1066-5099.

BOUCHLAKA, M. N. et al. Human Mesenchymal Stem Cell-Educated Macrophages Are a Distinct High IL-6-Producing Subset that Confer Protection in Graft-versus-Host-Disease and Radiation Injury Models. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 23, n. 6, p. 897-905, Jun 2017. ISSN 1083-8791.

BURNHAM, A. J.; FOPPIANI, E. M.; HORWITZ, E. M. Key Metabolic Pathways in MSC-Mediated Immunomodulation: Implications for the Prophylaxis and Treatment of Graft Versus Host Disease. **Front Immunol**, v. 11, p. 609277, 2020. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33365034> >.

BÁRCIA, R. N. et al. What Makes Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Superior Immunomodulators When Compared to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells? **Stem Cells Int**, v. 2015, p. 583984, 2015. ISSN 1687-966X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064137> >.

CAGLIANI, J. et al. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. **Journal of stem cell and regenerative biology**, v. 3, n. 2, p. 10.15436/2471-0598.17.022, 04/10 2017. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5667922/> >.

CAN, A.; CELIKKAN, F. T.; CINAR, O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. **Cytotherapy**, 2017/09/28/ 2017. ISSN 1465-3249. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324917306631> >.

CARUSO, S. R. et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. **Biotechnol Prog**, v. 30, n. 4, p. 889-95, Jul-Aug 2014. ISSN 1520-6033.

CECCARIGLIA, S. et al. Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 28-37, 01 2020. ISSN 1554-8635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31185790> >.

CEN, S. et al. Autophagy enhances mesenchymal stem cell-mediated CD4+ T cell migration and differentiation through CXCL8 and TGF- β 1. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 265, 08 23 2019. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31443687> >.

CHANG, J. et al. NF-kappaB inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting beta-catenin degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 23, p. 9469-74, Jun 04 2013. ISSN 0027-8424.

CHEN, A. K. et al. Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed. **Cytotherapy**, v. 17, n. 2, p. 163-73, Feb 2015. ISSN 1477-2566. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304664> >.

CHEN, C. et al. Mesenchymal stem cells upregulate Treg cells via sHLA-G in SLE patients. **Int Immunopharmacol**, v. 44, p. 234-241, Mar 2017. ISSN 1878-1705. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129605> >.

CHEN, K. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. **Clin Immunol**, v. 135, n. 3, p. 448-58, Jun 2010. ISSN 1521-7035. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207200> >.

CHEN, R. et al. CD147 deficiency in T cells prevents thymic involution by inhibiting the EMT process in TECs in the presence of TGF β . **Cell Mol Immunol**, v. 18, n. 1, p. 171-181, 01 2021. ISSN 2042-0226. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31900457> >.

CHEN, W. et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **J Immunol**, v. 181, n. 8, p. 5396-404, Oct 15 2008. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832696> >.

CHENG, N. C. et al. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 8, p. 584-94, Aug 2013. ISSN 2157-6564 (Print) 2157-6564.

CHEUNG, T. S. et al. Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity. **Haematologica**, v. 104, n. 10, p. e438-e441, 10 2019. ISSN 1592-8721. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30846505> >.

CHINNADURAI, R. et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived From Crohn's Patients Deploy Indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated Immune Suppression, Independent of Autophagy. **Mol Ther**, v. 23, n. 7, p. 1248-1261, Jul 2015. ISSN 1525-0024. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899824> >.

CHINNADURAI, R. et al. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells. **J Immunol**, v. 192, n. 4, p. 1491-501, Feb 15 2014. ISSN 0022-1767.

CHINNADURAI, R. et al. Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN γ priming. **Blood Adv**, v. 1, n. 11, p. 628-643, Apr 25 2017. ISSN 2473-9529 (Print) 2473-9529.

CHINNADURAI, R. et al. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach. **Cell Rep**, v. 22, n. 9, p. 2504-2517, Feb 27 2018.

CHUNG, D. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 555-63, Jul 16 2009. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465693> >.

COLLINO, F. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Hypoxia: Changes in Extracellular Vesicles Secretion and Improvement of Renal Recovery after Ischemic Injury. **Cell Physiol Biochem**, v. 52, n. 6, p. 1463-1483, 2019. ISSN 1421-9778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31099507> >.

CUNHA, B. et al. Filtration methodologies for the clarification and concentration of human mesenchymal stem cells. **Journal of Membrane Science**, v. 478, p. 117-129, 2015/03/15/ 2015. ISSN 0376-7388. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738814009442> >.

DAI, L. et al. KSHV activation of VEGF secretion and invasion for endothelial cells is mediated through viral upregulation of emmprin-induced signal transduction. **Int J Cancer**, v. 131, n. 4, p. 834-43, Aug 15 2012. ISSN 1097-0215. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918972> >.

DANG, S. et al. Autophagy regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Autophagy**, v. 10, n. 7, p. 1301-15, Jul 2014. ISSN 1554-8635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905997> >.

DAVIES, L. C. et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. **Stem Cells**, v. 35, n. 3, p. 766-776, Mar 2017. ISSN 1066-5099.

DE SOUSA PINTO, D. et al. Scalable Manufacturing of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Vertical-Wheel Bioreactor System: An Experimental and Economic Approach. **Biotechnol J**, v. 14, n. 8, p. e1800716, Aug 2019. ISSN 1860-7314. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30945467> >.

DE WITTE, S. F. H. et al. Toward Development of iMesenchymal Stem Cells for Immunomodulatory Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 648, 01/06. ISSN 1664-3224. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4701910/> >.

DE WITTE, S. F. H. et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. **Stem Cells**, v. 36, n. 4, p. 602-615, 04 2018. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29341339> >.

DERAKHTI, S. et al. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 103, p. 109782, Oct 2019. ISSN 1873-0191. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31349523> >.

DING, D. C. et al. Characterization of HLA-G and Related Immunosuppressive Effects in Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells. **Cell Transplant**, v. 25, n. 2, p. 217-28, 2016. ISSN 1555-3892. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26044082> >.

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. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

DOS SANTOS, F. et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. **J Cell Physiol**, v. 223, n. 1, p. 27-35, Apr 2010. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020504> >.

DOS SANTOS, F. et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 6, p. 1116-27, Jun 2014. ISSN 0006-3592.

DOS SANTOS, V. T. et al. Characterization of Human AB Serum for Mesenchymal Stromal Cell Expansion. **Transfus Med Hemother**, v. 44, n. 1, p. 11-21, Jan 2017. ISSN 1660-3796 (Print)

1660-3796.

DU-ROCHER, B. et al. IL-17 Triggers Invasive and Migratory Properties in Human MSCs, while IFN γ Favors their Immunosuppressive Capabilities: Implications for the "Licensing" Process. **Stem Cell Rev Rep**, v. 16, n. 6, p. 1266-1279, 12 2020. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33067729> >.

EBRAHIM, N. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorated Diabetic Nephropathy by Autophagy Induction through the mTOR Signaling Pathway. **Cells**, v. 7, n. 12, Nov 22 2018. ISSN 2073-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30467302> >.

EGGER, D. et al. Hypoxic Three-Dimensional Scaffold-Free Aggregate Cultivation of Mesenchymal Stem Cells in a Stirred Tank Reactor. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, 2017. ISSN 2306-5354.

EL OMAR, R. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? **Tissue Eng Part B Rev**, v. 20, n. 5, p. 523-44, Oct 2014. ISSN 1937-3368.

ESTRADA, J. C. et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 5, p. 743-55, May 2012. ISSN 1350-9047.

FALLARINO, F. et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J Immunol**, v. 176, n. 11, p. 6752-61, Jun 01 2006. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709834> >.

FEHRER, C. et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. **Aging Cell**, v. 6, n. 6, p. 745-57, Dec 2007. ISSN 1474-9718.

FENIZIA, C. et al. SARS-CoV-2 Entry: At the Crossroads of CD147 and ACE2. **Cells**, v. 10, n. 6, 06 08 2021. ISSN 2073-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34201214> >.

FRANCOIS, M. et al. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. **Mol Ther**, v. 20, n. 1, p. 187-95, Jan 2012. ISSN 1525-0016.

FRENETTE, P. S. et al. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 285-316, 2013. ISSN 0732-0582.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, Oct 1970. ISSN 0008-8730. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063> >.

GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 556-67, Aug 2009. ISSN 1474-1733.

GALIPEAU, J. et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 151-9, Feb 2016. ISSN 1465-3249.

GALIPEAU, J. et al. Mesenchymal stromal cell variables influencing clinical potency: the impact of viability, fitness, route of administration and host predisposition. **Cytotherapy**, v. 23, n. 5, p. 368-372, 05 2021. ISSN 1477-2566. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33714704> >.

GALLEU, A. et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 416, Nov 15 2017. ISSN 1946-6242. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29141887> >.

GAO, L. et al. Autophagy Improves the Immunosuppression of CD4+ T Cells by Mesenchymal Stem Cells Through Transforming Growth Factor- β 1. **Stem Cells Transl Med**, v. 5, n. 11, p. 1496-1505, Nov 2016. ISSN 2157-6564. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27400793> >.

GENG, J. et al. CD147 antibody specifically and effectively inhibits infection and cytokine storm of SARS-CoV-2 and its variants delta, alpha, beta, and gamma. **Signal Transduct Target Ther**, v. 6, n. 1, p. 347, 09 25 2021. ISSN 2059-3635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34564690> >.

GORNOSTAEVA, A. N. et al. Adipose-derived stromal cell immunosuppression of T cells is enhanced under "physiological" hypoxia. **Tissue Cell**, v. 63, p. 101320, Apr 2020. ISSN 1532-3072. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32223948> >.

GUO, H. et al. Ratio of CD147^{high}/CD147^{low} in CD4⁺CD25⁺ T cells: A potential biomarker for early diagnosis and prediction of response to therapy for autoimmune diseases. **Med Hypotheses**, v. 115, p. 1-4, Jun 2018. ISSN 1532-2777. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29685186> >.

HAN, X. et al. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 11, p. 1758-68, Nov 2014. ISSN 1350-9047.

HAN, Y. et al. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 109, p. 59-68, 04 2019. ISSN 1878-5875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30710751> >.

HAQUE, N. et al. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 632972, 08/27. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771429/> >.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 12, May 14 2011. ISSN 1478-811x.

HEATHMAN, T. R. J. et al. Development of a process control strategy for the serum-free microcarrier expansion of human mesenchymal stem cells towards cost-effective and commercially viable manufacturing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 200-209, 2019. ISSN 1369-703X.

HELGELAND, E. et al. Angiostatin-functionalized collagen scaffolds suppress angiogenesis but do not induce chondrogenesis by mesenchymal stromal cells in vivo. **J Oral Sci**, v. 62, n. 4, p. 371-376, Sep 26 2020. ISSN 1880-4926. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32684573> >.

HOFFMANN, A. et al. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 11, n. 9, p. 2565-2581, Sep 2017. ISSN 1932-6254.

HU, C. et al. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 120, 04 17 2019. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30995935> >.

HUANG, H. et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 10, p. 1332-43, Oct 2009. ISSN 1350-9047.

HUANG, W. et al. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 6, p. 1512-8, Jun 2006. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099.

KANG, I. et al. Donor-dependent variation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in response to hypoxic preconditioning and amelioration of limb ischemia. **Exp Mol Med**, v. 50, n. 4, p. 35, 04 2018. ISSN 2092-6413. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29674661> >.

KAWABATA, T.; YOSHIMORI, T. Autophagosome biogenesis and human health. **Cell Discov**, v. 6, n. 1, p. 33, 2020. ISSN 2056-5968. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32528724> >.

KE, X. et al. Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 α and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 8, p. 1598-607, Aug 2012. ISSN 1460-2180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678117> >.

KEHL, D. et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. **NPJ Regen Med**, v. 4, p. 8, 2019. ISSN 2057-3995. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31016031> >.

KHANDIA, R. et al. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. **Cells**, v. 8, n. 7, 07 03 2019. ISSN 2073-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31277291> >.

KLIMCZAK, A.; KOZLOWSKA, U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 4285215, 2016. ISSN 1687-966X (Print).

KONALA, V. B. et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. **Cytotherapy**, v. 18, n. 1, p. 13-24, Jan 2016. ISSN 1465-3249.

KONDO, M. et al. IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79463, 2013. ISSN 1932-6203.

KOTA, D. J. et al. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Traumatic Brain Injury. **Stem Cells**, v. 35, n. 5, p. 1416-1430, 05 2017. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233425> >.

KRSTIĆ, J. et al. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1853, n. 2, p. 431-44, Feb 2015. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25433194> >.

LAN, Y. W. et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 97, May 20 2015. ISSN 1757-6512.

LANDSKRON, J.; TASKÉN, K. CD147 in regulatory T cells. **Cell Immunol**, v. 282, n. 1, p. 17-20, Mar 2013. ISSN 1090-2163. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665204> >.

LAVINI-RAMOS, C. et al. MMP9 integrates multiple immunoregulatory pathways that discriminate high suppressive activity of human mesenchymal stem cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 874, Apr 13 2017. ISSN 2045-2322.

LAVRENTIEVA, A. et al. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 18, Jul 16 2010. ISSN 1478-811x.

LAWSON, T. et al. Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50L single-use stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 49-62, 2017. ISSN 1369-703X.

LE BLANC, K.; DAVIES, L. C. MSCs-cells with many sides. **Cytotherapy**, Feb 9 2018. ISSN 1465-3249.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 383-96, Apr 25 2012. ISSN 1474-1733.

LE FLOCH, R. et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 40, p. 16663-8, Oct 04 2011. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930917> >.

LEE, J. H.; YOON, Y. M.; LEE, S. H. Hypoxic Preconditioning Promotes the Bioactivities of Mesenchymal Stem Cells via the HIF-1 α -GRP78-Akt Axis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 21 2017. ISSN 1422-0067.

LEE, S.-G.; JOE, Y. A. Autophagy mediates enhancement of proangiogenic activity by hypoxia in mesenchymal stromal/stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 501, n. 4, p. 941-947, 2018/07/02/ 2018. ISSN 0006-291X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18311434> >.

LEROUX, L. et al. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. **Mol Ther**, v. 18, n. 8, p. 1545-52, Aug 2010. ISSN 1525-0016.

LI, D. et al. Overexpression of COX-2 but not indoleamine 2,3-dioxygenase-1 enhances the immunosuppressive ability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **Int J Mol Med**, v. 35, n. 5, p. 1309-16, May 2015. ISSN 1791-244X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25777747> >.

LI, X. et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 3, p. 695-704, Sep 2014. ISSN 1791-244X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970492> >.

LI, X. et al. Enhanced glucose metabolism mediated by CD147 contributes to immunosuppression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**, v. 69, n. 4, p. 535-548, Apr 2020. ISSN 1432-0851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31965268> >.

LIU, Y. et al. Prostaglandin E2 secreted by mesenchymal stem cells protects against acute liver failure via enhancing hepatocyte proliferation. **FASEB J**, v. 33, n. 2, p. 2514-2525, 02 2019. ISSN 1530-6860. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30260707> >.

MAO, Y. X. et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Pulmonary Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa* via Inhibiting Overproduction of Prostaglandin E2. **Stem Cells**, v. 33, n. 7, p. 2331-42, Jul 2015. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25788456> >.

MARKOV, A. et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 192, 03 18 2021. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33736695> >.

MAROTE, A. et al. MSCs-Derived Exosomes: Cell-Secreted Nanovesicles with Regenerative Potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 231, 08/03. ISSN 1663-9812. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971062/> >.

MATHEW, S. A.; CHANDRAVANSI, B.; BHONDE, R. Hypoxia primed placental mesenchymal stem cells for wound healing. **Life Sci**, v. 182, p. 85-92, Aug 01 2017. ISSN 0024-3205.

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. 4619-21, Jun 15 2004. ISSN 0006-4971. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001472> >.

MENDEZ-FERRER, S. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829-834, 08/12/print 2010. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09262> >.

MIZUKAMI, A. et al. Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 36-48, 2018. ISSN 1369-703X.

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. **Biotechnol J**, v. 11, n. 8, p. 1048-59, Aug 2016. ISSN 1860-6768.

MOJSILOVIC, S. et al. Interleukin-17 and its implication in the regulation of differentiation and function of hematopoietic and mesenchymal stem cells. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 470458, 2015. ISSN 0962-9351.

MOJSILOVIC, S. et al. IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. **Cell Tissue Res**, v. 346, n. 3, p. 305-16, Dec 2011. ISSN 0302-766x.

MOLOUDI, R. et al. Inertial-Based Filtration Method for Removal of Microcarriers from Mesenchymal Stem Cell Suspensions. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 12481, 08 2018. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30127526> >.

MOREIRA, F. et al. Successful Use of Human AB Serum to Support the Expansion of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell in a Microcarrier-Based Platform. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 8, p. 307, 2020. ISSN 2296-4185. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32373600> >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends Immunol**, v. 34, n. 3, p. 137-43, Mar 2013. ISSN 1471-4981. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103127> >.

MUNN, D. H. et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 633-42, May 2005. ISSN 1074-7613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894280> >.

NAJAR, M. et al. Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. **Inflamm Res**, Jan 23 2018. ISSN 1023-3830.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. **Immune Network**, v. 17, n. 2, p. 89-102, 04/20. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5407987/> >.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 160-71, Feb 2016. ISSN 1465-3249.

NAKATOGAWA, H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 8, p. 439-458, 08 2020. ISSN 1471-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32372019> >.

NIENOW, A. W. et al. Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 108, p. 24-29, 2016/04/15/ 2016. ISSN 1369-703X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X15300309> >.

NIENOW, A. W. et al. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 79-88, 2014/04/15/ 2014. ISSN 1369-703X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X14000278> >.

NOH, M. Interleukin-17A increases leptin production in human bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 5, p. 661-70, Mar 01 2012. ISSN 0006-2952.

NORONHA, N. C. et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 131, 05 2019. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31046833> >.

NÉMETH, K. et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nat Med**, v. 15, n. 1, p. 42-9, Jan 2009. ISSN 1546-170X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098906> >.

O'CONNOR, K. C. Molecular Profiles of Cell-to-Cell Variation in the Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells Int**, v. 2019, p. 5924878, 2019. ISSN 1687-966X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31636675> >.

ONO, T. et al. IL-17-producing gammadelta T cells enhance bone regeneration. **Nat Commun**, v. 7, p. 10928, Mar 11 2016. ISSN 2041-1723.

OSTA, B. et al. Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. **Front Immunol**, v. 5, p. 425, 2014. ISSN 1664-3224 (Print) 1664-3224.

OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Found Symp**, v. 136, p. 42-60, 1988. ISSN 0300-5208. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068016> >.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 12, p. 87-117, Aug 15 2010. ISSN 1523-9829.

PETIBONE, D. M.; MAJEED, W.; CASCIANO, D. A. Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity. **J Appl Toxicol**, v. 37, n. 1, p. 23-37, 01 2017. ISSN 1099-1263. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27682190> >.

PINTO, D. S. et al. Modulation of the in vitro angiogenic potential of human mesenchymal stromal cells from different tissue sources. **J Cell Physiol**, Feb 2020. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32037550> >.

PRASANNA, S. J. et al. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9016, Feb 2 2010. ISSN 1932-6203.

PREDA, M. B. et al. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. **Cell Death Dis**, v. 12, n. 6, p. 566, 06 02 2021. ISSN 2041-4889. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34075029> >.

QIAN, X. et al. Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes. **Stem Cell Rev Rep**, v. 17, n. 2, p. 411-427, Apr 2021. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32935222> >.

RADZIKOWSKA, U. et al. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. **Allergy**, v. 75, n. 11, p. 2829-2845, 11 2020. ISSN 1398-9995. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32496587> >.

RAFIQ, Q. A. et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. **Biotechnol Lett**, v. 35, n. 8, p. 1233-45, Aug 2013. ISSN 0141-5492.

RAGOTTE, R. J. et al. Human Basigin (CD147) Does Not Directly Interact with SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **mSphere**, v. 6, n. 4, p. e0064721, 08 25 2021. ISSN 2379-5042. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34378982> >.

REGMI, S. et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. **Eur J Cell Biol**, v. 98, n. 5-8, p. 151041, Dec 2019. ISSN 1618-1298. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31023504> >.

REGMI, S. et al. Enhanced viability and function of mesenchymal stromal cell spheroids is mediated via autophagy induction. **Autophagy**, 17:10, 2991-3010, Nov 2020.

REN, G. et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 2, p. 141-50, Feb 07 2008. ISSN 1875-9777.

RIFFELMACHER, T.; RICHTER, F. C.; SIMON, A. K. Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 199-206, 2018. ISSN 1554-8635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28806133> >.

ROCHA, J. L. M. et al. Mesenchymal Stromal Cells in Viral Infections: Implications for COVID-19. **Stem Cell Rev Rep**, Sep 2020. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32895900> >.

ROSOVA, I. et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, p. 2173-82, Aug 2008. ISSN 1066-5099.

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. 1114-28, Sep 2016. ISSN 1465-3249.

RUBINSZTEIN, D. C.; SHPILKA, T.; ELAZAR, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. **Curr Biol**, v. 22, n. 1, p. R29-34, Jan 10 2012. ISSN 1879-0445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240478> >.

SALAZAR-NORATTO, G. E. et al. Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. **Stem Cells**, v. 38, n. 1, p. 22-33, Jan 2020. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31408238> >.

SALDANHA-ARAUJO, F. et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem Cell Res**, v. 7, n. 1, p. 66-74, Jul 2011. ISSN 1873-5061.

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. 846-59, Jul 2016. ISSN 1465-3249.

SANTOS, F. et al. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 17, n. 12, p. 1201-10, Dec 2011. ISSN 1937-3384.

SAPAROV, A. et al. Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 3924858, 2016. ISSN 1687-966X (Print).

SELMANI, Z. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 212-22, Jan 2008. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932417> >.

SHI, Y. et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends in immunology**, v. 33, n. 3, p. 136-143, 01/07 2012. ISSN 1471-4906 1471-4981. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412175/> >.

SHI, Y. et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. **Nat Rev Nephrol**, v. 14, n. 8, p. 493-507, Aug 2018. ISSN 1759-507X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29895977> >.

SHIBUTANI, S. T. et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 10, p. 1014-24, Oct 2015. ISSN 1529-2916. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26382870> >.

SHIN, J. H.; SHIN, D. W.; NOH, M. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 12, p. 1835-44, Jun 15 2009. ISSN 0006-2952.

SIVANATHAN, K. N. et al. Transcriptome Profiling of IL-17A Preactivated Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study to Unmodified and IFN-gamma Modified Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Int**, v. 2017, p. 1025820, 2017. ISSN 1687-966X (Print).

SIVANATHAN, K. N. et al. Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. **Stem Cells**, v. 33, n. 9, p. 2850-63, Sep 2015. ISSN 1066-5099.

SOLSTAD, T. et al. CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells. **Blood**, v. 118, n. 19, p. 5141-51, Nov 10 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937704> >.

SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327-33, Feb 01 2008. ISSN 0006-4971. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951526> >.

TAVASSOLI, H. et al. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. **Biomaterials**, v. 181, p. 333-346, 10 2018. ISSN 1878-5905. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30098569> >.

TOZETTI, P. A. et al. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. **Biotechnol Prog**, May 09 2017. ISSN 1520-6033.

TSAI, A. C.; PACAK, C. A. Bioprocessing of Human Mesenchymal Stem Cells: From Planar Culture to Microcarrier-Based Bioreactors. **Bioengineering (Basel)**, v. 8, n. 7, Jul 07 2021. ISSN 2306-5354. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34356203> >.

TSAI, C. C. et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 459-69, Jan 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952688> >.

ULRICH, H.; PILLAT, M. M. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. **Stem Cell Rev Rep**, v. 16, n. 3, p. 434-440, 06 2020. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32307653> >.

WANG, H. Y. et al. Autophagy inhibition via Becn1 downregulation improves the mesenchymal stem cells antifibrotic potential in experimental liver fibrosis. **J Cell Physiol**, v. 235, n. 3, p. 2722-2737, 03 2020. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31508820> >.

WANG, J. et al. Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 15, 01 07 2021. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33413632> >.

WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nat Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1009-1016, 11//print 2014. ISSN 1529-2908. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3002> >.

WOBMA, H. M. et al. Dual IFN- γ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 45-56, 2018/03/01/ 2018. ISSN 2468-4988. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468498817300197> >.

XIONG, L.; EDWARDS, C. K.; ZHOU, L. The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 10, p. 17411-41, Sep 29 2014. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268615> >.

YU, J. et al. Hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells promote liver regeneration in a rat massive hepatectomy model. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 4, p. 83, Jul 2013. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856418> >.

ZHANG, H. et al. Immunomodulatory function of whole human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. **Molecular Immunology**, v. 87, p. 293-299, 7// 2017. ISSN 0161-5890. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017300743> >.

ZHAO, Y. et al. The role of EMMPRIN expression in ovarian epithelial carcinomas. **Cell Cycle**, v. 12, n. 17, p. 2899-913, Sep 01 2013. ISSN 1551-4005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966157> >.

ZHILAI, Z. et al. Preconditioning in lowered oxygen enhances the therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. **Brain Res**, v. 1642, p. 426-435, Jul 01 2016. ISSN 0006-8993.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I



COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER DE RIBEIRÃO PRETO - MATER

Ref.: Projeto de Pesquisa: Condicionamento de Células Estromais Mesenquimais de Cordão Umbilical com IL-17 ou Hipóxia para Tratamento de Colite Experimental.

Nº 004/2018

Nádia de Cássia Noronha

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 23/07/2018 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

- 1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
- 2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
- 3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
- 4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,


PROFª. DRª. CAROLINA SALES VIERA MACEDO

Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher

10.2. Anexo II



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 023/2018
 kms

Ribeirão Preto, 04 de dezembro de 2018.

À pós-graduanda
Nádia de Cássia Noronha
 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kelen C. Ribeiro Malmegrin de Farias
 FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “CONDICIONAMENTO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL COM IL-17 OU HIPÓXIA PARA TRATAMENTO DE COLITE EXPERIMENTAL”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 486 - CAAE: 98062918.8.0000.5403, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 183ª reunião ordinária, realizada em 03/12/2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.056.227.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Cleni Mara Marzocchi Machado

PROF^ª. DR^ª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
 Coordenadora do CEP/FCFRP

10.3. Anexo III



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 020/2020
 kms

Ribeirão Preto, 18 de junho de 2020.

À
Profª. Drª. Kelen Ribeiro Malmegrin de Farias
 Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
 FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que a criação do Biorrepositório sob sua responsabilidade intitulado “BIORREPOSITÓRIO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL” foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP em sua 198ª reunião ordinária, realizada em 18/06/2020.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos. Lembramos que ainda, que, de acordo com a Resolução 441/11, **toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado deverá ser submetida para aprovação deste CEP** e que a legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biorrepositórios.

Atenciosamente,

Profª. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
 Coordenadora do CEP/FCFRP

